

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Farmakoloji Anabilim Dalı**

**İNSAN İNTERNAL TORASİK ARTER
HALKALARINDA ADRENOMEDULLİN'İN ETKİLERİ:
SİKLOOKSİJENAZ, NİTRİK OKSİD SENTAZ VE
POTASYUM KANALLARININ ROLÜ**

Zeliha BAYRAM

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Farmakoloji Anabilim Dalı**

**İNSAN İNTERNAL TORASİK ARTER HALKALARINDA
ADRENOMEDULLİN'İN ETKİLERİ:
SİKLOOKSİJENAZ, NİTRİK OKSİD SENTAZ VE POTASYUM
KANALLARININ ROLÜ**

Zeliha BAYRAM

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sadi ÖZDEM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir
(Proje No: 2007.02.0122.003)

‘Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Farmakoloji Programı'nda Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir./...../2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sadi ¼ZDEM
Akdeniz ¼niversitesi Tıp Fak¼ltesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

¼ye: Prof. Dr. G¼lay şADAN
Akdeniz ¼niversitesi Tıp Fak¼ltesi
Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

¼ye: Prof. Dr. ağlar ¼ę¼TMAN
Akdeniz ¼niversitesi Tıp Fak¼ltesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

¼ye: Prof. Dr. Mehmet İSBİR
Akdeniz ¼niversitesi Tıp Fak¼ltesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

¼ye: Doç. Dr. İlhan G¼lbařı
Akdeniz ¼niversitesi Tıp Fak¼ltesi
Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../2009 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ¼ST¼NEL
Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Bu çalışmada, adrenomedullin (ADM)'nin insan internal torasik arter (ITA) halkalarındaki etkileri ve bu etkilerde siklooksijenaz, nitrik oksid (NO) sentaz, ve potasyum kanalları gibi çeşitli etkenlerin rolleri araştırılmıştır.

Çalışmada koroner arter bypass cerrahisine alınan hastalardan elde edilen operasyon sonrası artan (redundant) ITA örnekleri 3-4 mm genişliğinde halkalar halinde kesilmiş ve 20mL'lik organ banyolarına asılmıştır. İzometrik gerilim, bilgisayar bazlı bir data toplama sistemine bağlı izometrik transdüserler aracılığıyla sürekli kaydedilmiştir. Fenilefrin (10^{-6} M) ile önceden kasılmış insan ITA preparatlarında ADM (10^{-10} - 10^{-7} M) konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur. ADM'ye gevşeme yanıtları endoteli sağlam ITA halkalarında, endoteli zedelenmiş ITA halkalarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Dokuların 20 dakika süreyle siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) ile inkübasyonu ADM'ye gevşeme yanıtlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, NO sentaz blokörü N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (10^{-4} M) ile inkübasyonu ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. Spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ (5×10^{-5} M) ve putatif ADM reseptör antagonisti ADM₍₂₂₋₅₂₎ (10^{-7} M) de ADM'ye gevşeme yanıtlarında anlamlı bir azalma oluşturmuştur. İnsan ITA halkalarının 10 dakika süre ile K_v kanal blokörü 4-AP (5 mM) ya da 30 dakika süre ile K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M) ile inkübasyonu ADM'nin gevşetici etkisinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Diğer taraftan ADM ile oluşan gevşeme yanıtları büyük kondüktanslı Ca⁺² ile aktive edilen potasyum (BK_{Ca}) kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M) veya küçük kondüktanslı Ca⁺² ile aktive edilen potasyum (SK_{Ca}) kanal blokörü apamin (10^{-7} M) ile anlamlı olarak azalmıştır. Dokuların BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M) ve SK_{Ca} kanal blokörü apamin (10^{-7} M) kombinasyonu ile 30 dakika süre inkübasyonu, ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında daha belirgin bir inhibisyon oluşturmasına karşın kombinasyonun inhibitör etkisi tek başına karibdotoksin veya apaminin inhibitör etkileri ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada literatürde ilk defa olmak üzere ADM'nin insan ITA preparatında fonksiyonel gevşetici etkisine yönelik farmakolojik kanıt sağlanmıştır. Elde edilen bulgular insan ITA preparatlarında ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında hem kalsiyumla aktive edilen potasyum kanallarının hem de NO salınması aracılığı ile endotelin temel bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: Adrenomedullin, insan internal torasik arteri, vazodilatasyon, potasyum kanalları, nitrik oksid

ABSTRACT

In the present study, we investigated both the effects of adrenomedullin (ADM) and the role(s) of cyclooxygenase, nitric oxide (NO) synthase and various potassium channels in the effects of ADM on human internal thoracic artery (ITA) rings.

Samples of redundant ITA obtained from patients undergoing a coronary artery bypass graft surgery were cut into 3-4 mm wide rings and suspended in 20 mL organ baths. Isometric tension was continuously recorded with an isometric force transducer connected to a computer-based data acquisition system. ADM (10^{-10} - 10^{-7} M) produced concentration-dependent relaxation responses in human ITA rings precontracted by 10^{-6} M phenylephrine. The relaxant responses to ADM were significantly higher in endothelium-intact than endothelium-denuded preparations. Incubation of human ITA rings with cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10^{-5} M) for 20 min did not cause a significant decrease in relaxant responses to ADM, while 10^{-4} M of NO synthase inhibitor N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) caused a significant decrease. Both specific guanylyl cyclase inhibitor ODQ (5×10^{-5} M) and ADM receptor antagonist ADM₍₂₂₋₅₂₎ (10^{-7} M) also caused significant decreases in relaxant responses to ADM. Incubation of human ITA rings with the voltage-dependent potassium (K_V) channel blocker 4-aminopyridine (5 mM) for 10 min or ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channel blocker glibenclamide (10^{-5} M) for 30 min did not cause a significant alteration in vasodilatory effect of ADM. The ADM-induced relaxation was significantly blunted by (10^{-7} M) charybdotoxin (a high-conductance Ca²⁺-activated potassium (BK_{Ca}) channel blocker) or apamin (a small-conductance Ca²⁺-activated potassium (SK_{Ca}) channel blocker). Incubation of human ITA rings with BK_{Ca} channel blocker charybdotoxin (10^{-7} M) together with SK_{Ca} channel blocker apamin (10^{-7} M) for 30 min significantly inhibited the ADM-induced relaxation, whereas the inhibitor effect of this combination was not significantly different than the inhibitor effects of charybdotoxin or apamin alone.

In conclusion, present study provided, for the first time, pharmacological evidence about the functional relaxant effect of ADM in human ITA preparations. The findings suggested that both K_{Ca} channels and endothelium, through release of NO play a major role in ADM-induced relaxation responses in isolated human ITA preparations.

Key words: Adrenomedullin, human internal thoracic artery, vasodilation, potassium channels, nitric oxide.

TEŞEKKÜR

Sayın Hocam Prof. Dr. Sadi ÖZDEM'e yüksek lisans çalışmalarımda olduğu gibi tezimin hazırlanmasında gösterdiği öncülük, titizlik, özveri ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca başta Anabilim Dalımız Başkanı Prof. Dr. Gülay ŞADAN olmak üzere diğer öğretim üyelerimize, çalışma arkadaşlarıma ve desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Adrenomedullin	2
2.1.1. Adrenomedullin'in Kimyasal Yapısı	2
2.1.2. Genetik Yapısı ve Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	3
2.1.3. Biyosentez, Sekresyonu ve Dağılımı	4
2.1.4. Metabolizma ve Eliminasyon	6
2.1.5. Reseptörleri ve Sinyal İletim Yolağı	7
2.1.6. Adrenomedullin'in Fizyolojik Etkileri	8
2.1.6.1. Vasküler Etkileri	9
2.1.6.2. Kardiyak Etkileri	9
2.1.6.3. Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	10
2.1.6.4. Renal Etkileri	10
2.1.6.5. Pulmoner Etkileri	11
2.1.6.6. Büyümenin Düzenlenmesi	11
2.1.6.7. Hormon Düzenlenmesi	11
2.1.6.8. Adrenomedullin'in Diğer Fonksiyonları	12

2.1.7. Adrenomedullin ve Klinik	13
2.1.7.1. Kardiyovasküler Hastalıklar	13
2.1.7.2. Renal Hastalıklar	14
2.1.7.3. Septik Şok	15
2.1.7.4. Diyabet	15
2.1.7.5. Kanser	16
2.2. Düz Kasta Eksitasyon Kontraksiyon Kenetlenme Mekanizması	16
2.3. Adrenomedullin'in vasküler düz kas gevşetici etkisinde rol oynayan mekanizmalar	17
2.3.1. sAMP Yolağı	17
2.3.2. NO ve sGMP Yolağı	18
2.3.3. Potasyum Kanalları	19
2.3.4. Prostaglandinler	20
GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Dokunun Elde Edilişi	21
3.2. Deney Protokolü	21
3.3. Deneylerde Kullanılan İlaçlar	22
3.4. İstatistiksel Analiz	22
BULGULAR	23
TARTIŞMA	27
SONUÇLAR	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

sAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
ADM	:	Adrenomedullin
CGRP	:	Kalsitonin geniyle ilişkili peptid
PAMP	:	Proadrenomedullin N-terminal 20 peptid
LPS	:	Lipopolisakkaritler
Ang II	:	Anjiotensin II
NO	:	Nitrik oksid
CL	:	Kalsitonin reseptör benzeri reseptör
RAMP	:	Reseptör aktivasyonu modifiye edici protein
NOS	:	Nitrik oksid sentaz
i.c.v	:	İntraserebroventriküler
ACTH	:	Adrenokortikotropik hormon
DOCA	:	Deoksikortikosteron asetat
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
MHZK	:	Miyozin hafif zincir kinaz
PKA	:	Protein kinaz A
sGMP	:	Siklik guanozin monofosfat
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksid sentaz
nNOS	:	Nöronal nitrik oksid sentaz
L-NAME	:	N ^w -nitro-L-arginin metil ester
K_{ATP} Kanalları	:	ATP duyarlı potasyum kanalları
K_{Ca} Kanalları	:	Ca ⁺² ile aktive edilen potasyum kanalları
BK_{Ca} Kanalları	:	Büyük kondüktanslı kalsiyumla aktive edilen potasyum kanalları
SK_{Ca} Kanalları	:	Küçük kondüktanslı kalsiyumla aktive edilen potasyum kanalları
K_v Kanalları	:	Voltaj bağımlı potasyum kanalları
4-AP	:	4-Aminopiridin
PSS	:	Fizyolojik tuz solüsyonu
ITA	:	İnternal torasik arter

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan ADM Molekülünün Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2.2. İnsan ve Diğer Türlerin ADM Yapısının Karşılaştırılması	3
Şekil 2.3. ADM ve PAMP Geninin Moleküler Yapısı	4
Şekil 2.4. Vasküler Düz Kas Hücrelerinden ADM Salınımını Artıran ya da Azaltan Faktörler	6
Şekil 2.5. ADM Reseptörleri	8
Şekil 2.6. ADM'nin Fizyolojik Etkileri	12
Şekil 2.7. ADM'nin Endotel Bağımsız ve Endotel Bağımlı Vazodilatör Etki Mekanizması	19
Şekil 4.1. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam ve zedeli insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları	24
Şekil 4.2. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=8) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M, 20 dk., n=8) ve nitrik oksid sentaz blokörü L-NAME (10^{-4} M, 20 dk., n=7) inkübasyonunun etkisi	24
Şekil 4.3. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=7) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ inkübasyonunun (5×10^{-5} M, 20 dk., n=8) etkisi	25
Şekil 4.4. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=10) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde putatif adrenomedullin (ADM) reseptör antagonisti ADM ₍₂₂₋₅₂₎ inkübasyonunun (10^{-7} M, 20 dk., n=7) etkisi	25

- Şekil 4.5.** Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=8) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde K_V kanal blokörü 4-aminopridin (4-AP, 5mM, 10 dk., n=10), ve K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M, 30 dk., n=8) inkübasyonunun etkileri. **26**
- Şekil 4.6.** Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=8) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde, BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M, 30 dk., n=6), SK_{Ca} kanal blokörü apamin (10^{-7} M, 30 dk., n=8) ve karibdotoksin (10^{-7} M) + apamin (10^{-7} M, n=6) inkübasyonunun etkileri. **26**

GİRİŞ

Adrenomedullin, ilk olarak insan feokromositomasından izole edilmiş olan ve 52 aminoasit içeren vazodilatör bir peptiddir (1). Başta adrenal medulla olmak üzere myokard, akciğerler, santral sinir sistemi, endotel ve vasküler düz kas hücreleri gibi pek çok doku ve hücrede sentezlenmekte ve çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedir (2-4).

Adrenomedullin'in temel biyolojik etkilerinden biri vazodilatasyondur. Adrenomedullin'in hem in vivo hem de in vitro vazodilatör etkisi olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, adrenomedullin ile oluşan vazodilatasyonun mekanizması tam olarak anlaşılammış ve değişik mekanizmalar ileri sürülmüştür. Adrenomedullin'in vasküler düz kas hücre kültürlerinde siklik adozin monofosfat üretimini stimüle etmesi, adrenomedullin ile oluşan vazodilatasyonda bu yolağının rolü olabileceğini düşündürmektedir (5-7). Diğer taraftan adrenomedullin ile oluşan vazodilatasyonun bir kısmının endotel-bağımlı olduğu ve nitrik oksid oluşumu aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir (8, 9). Köpek koroner vasküler yatağı (10), sıçan serebral arteriyolları (11) ve insan koroner arteriyollarındaki (9) vazodilatör etkisinde ise potasyum kanallarının rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sıçan aortunda adrenomedullin'in inozitol trifosfat aktivasyonu (12) aracılığı ile vazodilatör etki gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular adrenomedullin'in vazodilatör etkisinde rol oynayan mekanizma/lar'ın incelenen damar ve/veya türe göre değiştiğini düşündürmektedir.

İnsan internal torasik arteri koroner arter bypass graftı cerrahisinde sık bir şekilde kullanılmaktadır. Adrenomedullin'in bu dokudaki etkisine yönelik bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Gerek internal torasik arterin koroner arter bypass graftı için sık kullanılan bir doku olması, gerekse adrenomedullin'in çeşitli kardiyovasküler patofizyolojik durumlarda rol oynaması, adrenomedullin'in bu dokudaki olası etkilerinin ve bu etkilerde rol oynayan mekanizma/lar'ın belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, adrenomedullin'in insan internal torasik arter halkalarındaki etkileri ve bu etkilerde endotel, nitrik oksid, prostanoidler ve potasyum kanalları gibi çeşitli faktörlerin olası rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

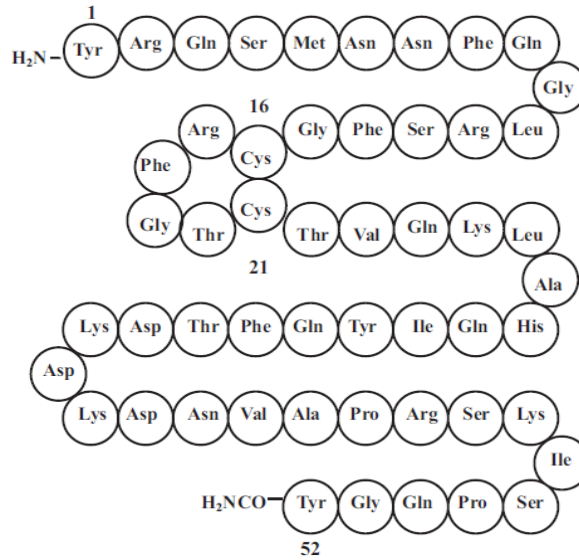
GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenomedullin

Kitamura ve arkadaşları 1993 yılında bazı peptidlerin sıçan trombositlerinde siklik adenozin monofosfat (sAMP) düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırırken feokromositoma hücrelerinden yeni bir peptid elde etmişlerdir. Bu peptide yalnızca feokromositoma dokusunda değil, normal adrenal medullada da yoğun olarak bulunduğu için adrenomedullin (ADM) adını vermişlerdir (1). Kısa bir süre sonra insan ve sıçan ADM'sini kodlayan genler belirlenmiştir (13, 14). Sonraki iki yıl içerisinde değişik klinik durumlarda plazma ADM düzeyleri ölçülmüş, ADM reseptörleri tanımlanmış ve ADM ile pek çok çalışma yapılmıştır. Zaman içerisinde ADM'nin adrenal medulla yanı sıra diğer dokulardan da salgılandığı ve hem dolaşımında bir hormon hem de çeşitli biyolojik aktivitelere sahip lokal parakrin bir mediyatör olduğu gösterilmiştir (2).

2.1.1. Adrenomedullin'in Kimyasal Yapısı

İnsan ADM'si karboksi terminalinde aminlenmiş tirozin içeren, 16 ve 21. sistein rezidüleri arasında tek bir disülfid köprüsü bulunan 52 aminoasitten oluşan peptid yapısında bir moleküldür. Yapısal olarak kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP) ve amilin ile homoloji gösterdiği için kalsitonin/CGRP/amilin peptid ailesine dahil edilmiştir. Bu peptidlerin ortak kimyasal benzerlikleri, 6 aminoasit halkası içermeleri ve karboksi terminalinde aminlenmiş tirozin taşımalarıdır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnsan ADM Molekülünün Kimyasal Yapısı

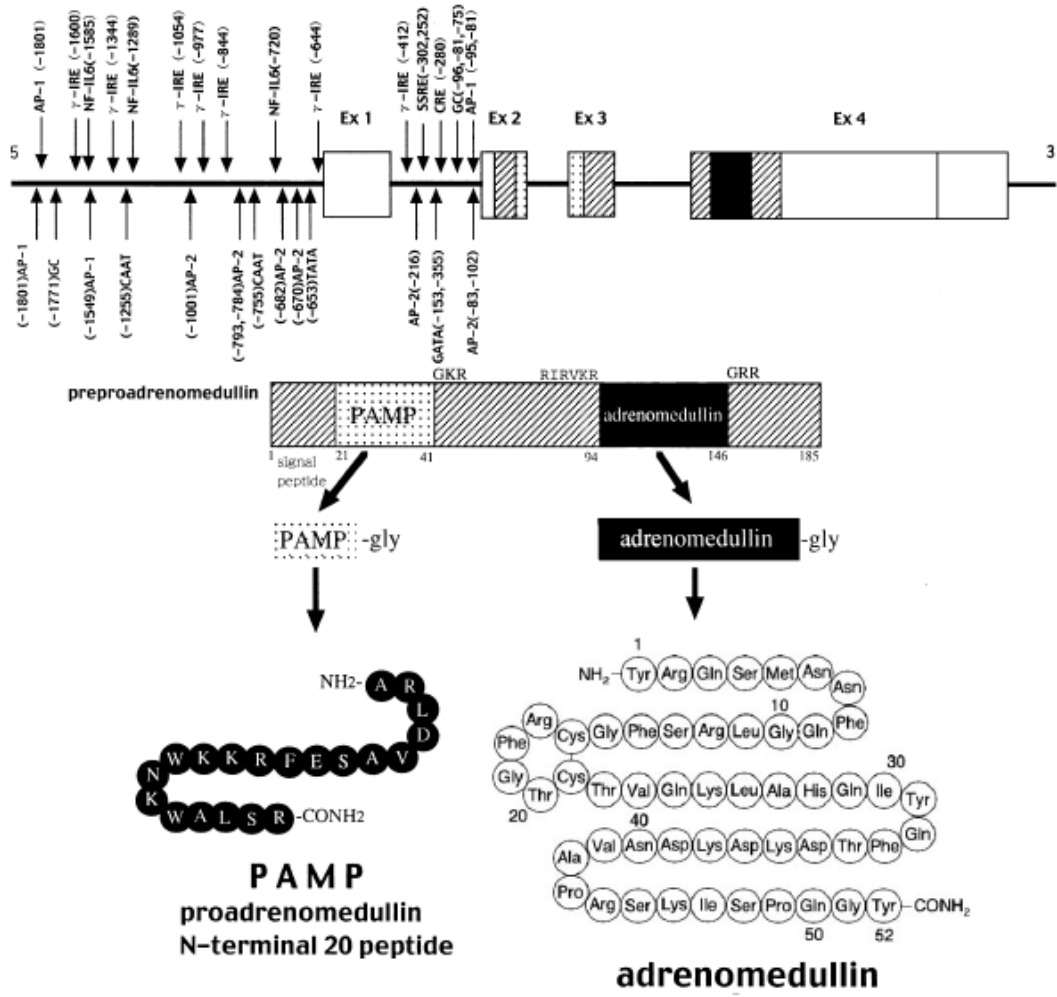
ADM molekülündeki disülfid köprüsü ve C-terminalindeki amidasyon, sAMP üretimi ve reseptör bağlanması için gerekli yapılardır. İnsan ADM'si diğer türlerin ADM'si ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir (Şekil 2.2) (15).

Türler	Aminoasit Dizisi
İnsan	H ₂ N-YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-CONH ₂
Domuz	H ₂ N-YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDGVAPRSKISPQGY-CONH ₂
Sığır	H ₂ N-YRQSLNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYHFTDKDKDGSAPRSKISPQGY-CONH ₂
Sıçan	H ₂ N-YRQSMN--QGSRSFGCRFGTCTMQLAHQIYQFTDKDKDGMAPRNKISPQGYCONH ₂
Fare	H ₂ N-YRQSMN--QGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMAPRNKISPQGY-CONH ₂

Şekil 2.2. İnsan ve Diğer Türlerin ADM Yapısının Karşılaştırılması

2.1.2. Adrenomedullin'in Genetik Yapısı ve Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

ADM'nin keşfedilmesinin ardından önce sıçanlarda sonrasında ise insanlarda tamamlayıcı DNA dizisi tanımlanmıştır (13, 14). İnsan ADM geni 11. kromozoma yerleşmiştir. Dört exon ve üç intron bölgesi bulunmaktadır. ADM sentezi sırasında önce ADM prekürsörü olan ve 185 aminoasit içeren "preproadrenomedullin" oluşmakta, bu molekülün terminalinden aminoasitlerin ayrılması ile önce 164 aminoasit içeren proadrenomedullin (proADM) peptidi, proADM'den ise immatur ve inaktif ADM-Gly molekülü sentezlenmektedir. Bu şekilde oluşan immatur ADM-Gly'nin matur ADM'den farkı glisin aminoasiti içermesidir. ADM-Gly'den enzimatik oksidasyon ile 52 aminoasit içeren ve biyolojik olarak aktif olan ADM üretilmektedir. Ayrıca, preproADM'den proadrenomedullin N-terminal 20 peptid (PAMP) üretilmektedir. PAMP biyolojik olarak aktif bir peptid olmasına karşın etki gücü ADM'ye göre daha düşüktür. ADM'yi 4. exon, PAMP'ı ise 2. ve 3. exonlar kodlamaktadır (Şekil 2.3) (16).



Şekil 2.3. ADM ve PAMP Geninin Moleküler Yapısı

2.1.3. Biyosentez, sekresyonu ve dağılımı

ADM'nin sentez ve salgılanmasındaki mekanizmalar halen tam olarak anlaşılammıştır. ADM üretiminin değişik dokularda çeşitli mekanik ve humoral faktörlerle lokal olarak kontrol edildiği düşünülmektedir. Oldukça hızlı bir şekilde üretilen ADM depolanmamakta, sentezlendikten hemen sonra salgılanmaktadır. Bununla birlikte, pankreas, endokrin hücreler ve adrenal medulla gibi belirli alanlarda depolanabildiği ileri sürülmektedir (3).

Sağlıklı kişilerde ADM plazma konsantrasyonunun 1-10 pM arasında olduğu ve cinsiyet ya da yaşa bağımlı değişkenlik göstermediği bilinmektedir. ADM ilk olarak feokromositomadan izole edilmiş olmasına karşın sonraki çalışmalarda normal adrenal medulladan ve kalp, akciğer, böbrek ve endotel gibi değişik dokulardan da salgılandığı gösterilmiştir. ADM plazmada kompleman faktör H olarak da tanımlanan adrenomedullin bağlayan protein-1 adı verilen bir proteine bağlanmaktadır (17).

ADM pek çok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. Adrenal bezler, hipotalamus ve ön hipofiz ADM konsantrasyonunun en yüksek olduğu dokulardır.

Böbrek, akciğer, mide, barsak, özefagus, pankreas, uterus, damarlar ve kalpte de yüksek oranda ADM eksprese edilmektedir. İmmun boyama ile makrofajlar, safra kanalı, tükürük bezleri, epididimis, uterus, meme bezleri, deri, ter bezleri, kıkırdak ve plasentada da ADM belirlenmiştir (18). Vücutta hemen hemen her dokuda sentezlenebilmesi ADM'nin pek çok biyolojik aktivitede rolü olabileceğini ve ADM ekspresyonunun kontrolü için sıkı bir düzenleme sistemine gereksinim olduğunu düşündürmektedir.

Kardiyovasküler sistemde ADM atrium, ventriküller ve kan damarlarında üretilmektedir. Basınç/volüm artışı, mekanik stres ve hipoksinin, kardiyomiyositlerden ADM salınımını stimüle edebileceği bildirilmiştir. ADM'nin atriumlarda ventriküllere oranla daha yoğun olduğu gözlenmiştir (19). Vasküler dokuda ADM hem endotel hem de düz kas hücreleri tarafından sentez edilip salgılanmaktadır. Hernekadar adrenal bezler en yüksek doku ADM konsantrasyonuna sahipse de endotel hücreleri adrenal beze göre 20 kat, düz kas hücreleri ise 3-4 kat daha fazla ADM mRNA'sı eksprese etmektedirler (20).

Kardiyovasküler dokular dışında akciğerler (kolumnar epitel, endotel hücreleri, kondrositler, alveolar makrofajlar), düz kas hücreleri ve böbreklerde de (glomerulus, toplayıcı kanallar, mezengial hücreler) ADM sentezlendiği gösterilmiştir. Böbreklerde yüksek miktarlarda ADM bulunması, buranın önemli bir ADM kaynağı olabileceğine işaret etmektedir (17).

Santral sinir sisteminde talamus ve hipotalamusta yüksek düzeylerde, korteks, medulla, pons ve serebellumda ise daha düşük düzeylerde ADM olduğu gösterilmiştir (15). Beyin omurilik sıvısında ADM konsantrasyonu plazmadan daha düşüktür. Hamilelik sırasında plazma ADM konsantrasyonu artarken beyin omurilik sıvısı konsantrasyonunda değişiklik gözlenmez. Bu durum ADM'nin her iki kompartmanda salınımının birbirinden bağımsız olduğunu göstermektedir (21).

ADM endokrin sistemde pek çok bölgede lokalize olmuştur; kromafin hücrelerde, adrenal korteksin zona glomerulosa ve fasciculatasında yer almaktadır. İlginç olarak adrenal bez vasküler endotelinde ADM ekspresyonu gösterilememiştir. Hipofiz ekstresindeki konsantrasyonu beyindekienden daha yüksektir. ADM pankreasın Langerhans adacıklarında ve gastrointestinal nöroendokrin sistemde de lokalize olmuştur (22).

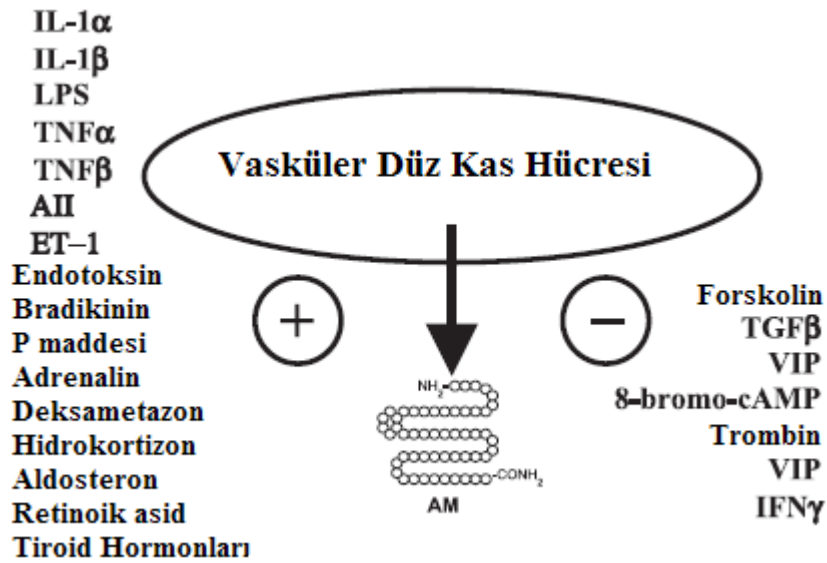
Karaciğer, kolon, incebarsak ve submandibular bezlerde çok düşük düzeylerde ADM'ye rastlanmıştır. Çeşitli gastrointestinal bezlerde ve epitelde, sıçanların gastrik mukozasında ADM varlığı belirlenmiştir. ADM immün boyaması safra kanalı epitelinde ve safra kesesi mukozal epitelinde gösterilmiş ancak hepatositlerde gösterilememiştir. ADM duysal organlarda da bulunmaktadır; fare embriyosunun kohlear epitelinde gösterilmiştir.

ADM, kadınlarda üreme sisteminde özellikle kan damarlarında, fallop tüpleri ve uterusun epitel hücrelerinde lokalize olmuştur. Sıçan ve insan plasentasında ADM ekspresyonu saptanmıştır. ADM'nin meme bezlerinde mevcut olduğu ve süte salgılandığı düşünülmektedir. Erkek üreme sisteminde en yüksek düzeyde prostatda bulunur ve ekspresyonu androjenler tarafından indüklenir. Ayrıca deride epitel hücrelerde, keratositler, saç folikülleri, ter bezleri ve yağ bezlerinde bulunmaktadır. ADM, dalakta ve bağ dokusunda da lokalize olmakta, mast hücreleri, granülosit,

lenfosit, ve dolaşımdaki monositler gibi kan komponentlerinde de yer almaktadır. Yetişkin osteoblastları da ADM üretmekte ve ADM reseptörleri içermektedir (15).

ADM mRNA ekspresyonundaki çeşitlilik, ADM'nin hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde otokrin ya da parakrin bir düzenleyici olmasının yanısıra bir hormon olarak da rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Vasküler düz kas hücrelerinde ADM üretimini in vitro stimüle eden faktörler arasında interlökin-1 α ve β , lipopolisakkaritler (LPS), tümör nekroze edici faktör α ve β , endotoksin, anjiotensin II (Ang II), endotelin-1, bradikinin, P maddesi, adrenalin, deksametazon, hidrokortizon, aldosteron, retinoik asid ve tiroid hormonları bulunmaktadır. Glukokortikoidlerin ve tiroid hormonlarının vasküler endotel hücre kültürlerinde ADM mRNA düzeylerini artırdığı gözlenmiştir (17). Sitokinler gibi inflamatuvar modülatörler ADM üretiminin önemli stimülanlarıdır ve inflamasyon sırasında nitrik oksid (NO)-bağımlı ve NO-bağımsız yollarla ADM salınımında rol oynamaktadır (23). Anestezi altındaki köpeklere intravenöz LPS uygulanması plazma ADM konsantrasyonlarını yükseltmekte, kalp, akciğerler, karaciğer ve böbrekte ADM mRNA ekspresyonunu artırmaktadır. Forskolin, transforming büyüme faktörü β , 8-bromo-sAMP, trombin, vazoaaktif intestinal polipeptid ve interferon- γ ise ADM salınımını azaltan faktörlerdir (17).



Şekil 2.4. Vasküler Düz Kas Hücrelerinden ADM Salınımını Artıran ve Azaltan Faktörler

2.1.4. Metabolizma ve Eliminasyon

ADM'nin metabolizması ve eliminasyonu halen tam olarak bilinmemekle birlikte dolaşımdaki ADM'nin oldukça hızlı bir şekilde metabolize edildiği ve yarılanma ömrünün 20 dakika olduğu bildirilmiştir (24).

Sağlıklı kişilerde idrar ADM konsantrasyonu plazmaya göre yaklaşık 6 kat daha yüksek bulunmuş ve böbreklerin ADM ekskresyonunda temel bir bölge olduğu ileri sürülmüştür (25). Akut myokard infarktüsü sırasında hem idrar hem de plazma

ADM düzeylerinde paralel bir artma gözlenmesi de ADM'nin temel olarak idrar yolu ile atılabileceğini düşündürmektedir (26). Ayrıca renal ADM üretiminin arttığı durumlarda glomeruldan süzülüp proksimal tübülde nötral endopeptidazlar ile yıkılabileceğini gösteren çalışmalarda ADM'nin üriner yolla elimine edildiğine işaret edilmektedir (24).

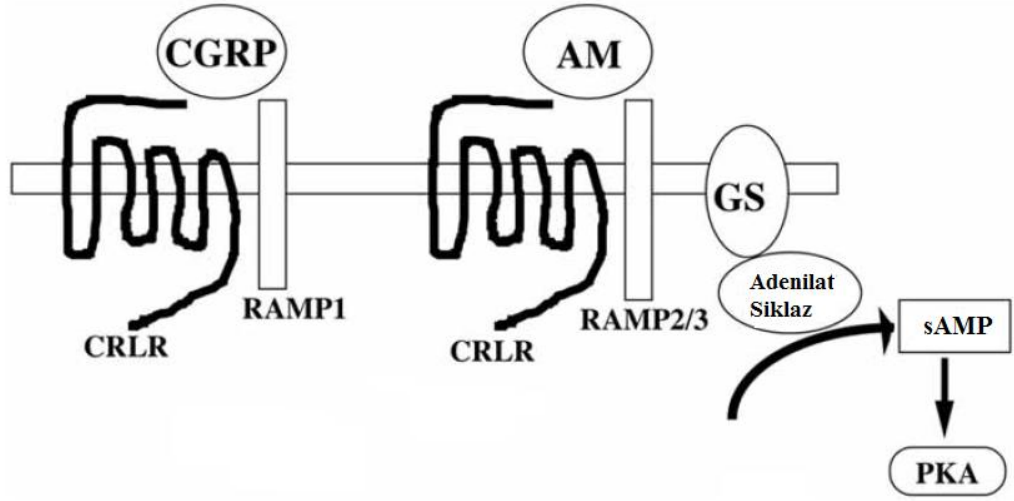
Diğer taraftan insanlarda plazma ADM konsantrasyonunun aorttaki miktarının pulmoner arterdekenden anlamlı ölçüde daha düşük olduğu ve ADM'nin sistemik vazodilatör etkisinin pulmoner dolaşımında ilk geçiş eliminasyonu sonucu azaldığı bildirilmiştir. Bu nedenle ADM'nin pulmoner yolla da elimine edilebileceği ileri sürülmüştür. (3).

2.1.5. Reseptörleri ve Sinyal İletim Yolu

ADM, CGRP ailesinin bir üyesi olmakla birlikte CGRP gibi sadece nöral dokudan sentezlenmeyip birçok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. ADM reseptör bağlanma bölgeleri önce sıçanlarda daha sonra insanlarda belirlenmiştir. Sıçanlarda sırasıyla kalp, akciğerler, adrenal bezler, böbrek ve santral sinir sisteminde yüksek düzeylerde bulunmuştur. İnsanlarda ise mikrovasküler endotelde, saçlı deride ve gastrointestinal immün sistemde yoğun olarak yer almaktadır (15).

ADM'nin biyolojik etkilerini CGRP₁ reseptörleri ve spesifik ADM reseptörleri (ADM₁ ve ADM₂) aracılığı ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. En iyi bilinen CGRP/ADM reseptör kompleksi kalsitonin reseptör benzeri reseptör'(CL) dır. CL, 1993'te klonlanmıştır ve 7 transmembran segmentli G protein kenetli reseptör ailesindedir. CGRP ailesi peptidlerinden ADM ve CGRP'yi bağlayabilir. Bu reseptör fonksiyonel olabilmek için hücre membranında bulunan "reseptör aktivasyonu modifiye edici protein (RAMP)" adı verilen bir proteine gereksinim duymaktadır. CL ve RAMP arasındaki kombinasyonun gerçek bir ADM reseptörüne karşılık geldiği anlaşılmıştır. RAMP'lar serpentin reseptör ailesinin bir üyesi olup, CL'nin hücre membranına tutunması, reseptör spesifitesinin, desensitizasyonunun ve ligand afinitesinin düzenlenmesi, farmakolojik selektivitesinin sağlanması ve G proteinleri ile fonksiyonel etkileşimi gibi önemli fonksiyonlara aracılık etmektedir (27).

Değişik RAMP'ların CL'ye bağlanması ligand spesifikliğinin kontrolünü sağlar. İnsanda tip 1, 2 ve 3 olmak üzere, üç farklı RAMP bulunmaktadır. Bunlar CL ile farklı farmakolojik üçlü kombinasyonlar oluştururlar. CL/RAMP1 kompleksi CGRP₁ reseptör özelliği, CL/RAMP2 ve CL/RAMP3 kompleksleri ise sırasıyla ADM₁ ve ADM₂ reseptör özellikleri göstermektedir (Şekil 2.5) (18).



Şekil 2.5. ADM Reseptörleri

İnsanlar ve sıçanlarda RAMP proteinlerinin mRNA dağılımları belirlenmiştir. RAMP1 özellikle beyin, yağ dokusu, timus ve dalakta; RAMP2 yağ dokusu, aorta, dalak ve akciğerlerde; RAMP3 ise en çok böbrek ve akciğerlerde bulunmaktadır. CGRP₁ reseptörleri CL/RAMP1 kompleksine yüksek afinite gösterirken, ADM₁ reseptörleri CL/RAMP2'ye, ADM₂ reseptörleri ise CL/RAMP3 kompleksine yüksek afinite göstermektedir. Reseptör-RAMP kompleksi oluştuğunda CGRP₁ reseptörleri tamamen glikolize olmakta, ADM₁ ve ADM₂ reseptörlerinin ise sadece merkezinde glikolizasyon gerçekleşmektedir. Glikolizasyon reseptörde konformasyonel değişikliğe yol açarak peptidlerin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (17).

İnsan ADM ve CGRP reseptör antagonistleri (ADM₂₂₋₅₂ ve CGRP₈₋₃₇) kullanılarak spesifik ADM reseptörleri arasındaki farklar belirlenmiştir. ADM₂₂₋₅₂, CL/RAMP3 (ADM₂) reseptörlerine göre CL/RAMP2 (ADM₁) reseptörlerine daha fazla selektivite göstermektedir. Yani ADM'nin ADM₁ reseptörleri aracılığı ile oluşturduğu yanıtlar CGRP₈₋₃₇'e göre ADM₂₂₋₅₂ ile daha güçlü bir şekilde bloke olmaktadır (28). ADM₂ reseptörleri ise CGRP₈₋₃₇'e daha duyarlıdır. ADM₁ reseptörlerinin CGRP ve diğer peptidlere kıyasla ADM'ye daha spesifik olduğu, buna karşın ADM₂ reseptörlerinin ise daha çok CGRP'ye afinite gösterdiği saptanmıştır.

ADM'nin CL' ye bağlanmasından sonra CL, Gs proteini aracılığıyla adenilat siklaz-protein kinaz A yolağıyla hedef hücrede primer ikincil haberci olarak sAMP'de artmaya neden olur (Şekil 2.5). ADM ile stimülasyondan sonra gelişen olayların sAMP aracılı olduğu pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır.

2.1.6. Adrenomedullin'in Fizyolojik Etkileri

ADM vazodilatör etkisi yanı sıra bronkodilatasyon, nörotransmisyon, hormon regülasyonu, antimikrobiyal aktivite, renal fonksiyonların kontrolü ve büyümenin düzenlenmesi gibi çeşitli olaylarda rol oynamaktadır (Şekil 2.6).

2.1.6.1. Vasküler Etkileri

İnsanlar da dahil olmak üzere pek çok türde ADM ve biyolojik olarak aktif ADM fragmanlarının güçlü sistemik ve pulmoner vazodilatör etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (29-31). İn vitro çalışmalarda köpek mezenterik, koroner, renal, femoral (32) ve baziler (33) arterlerinde ADM'nin doza bağımlı gevşeme yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir. Bu gevşetici etki endotelli arterlerde endotelsizlere göre daha belirgin bulunmuştur (32). Benzer şekilde insan ADM₁₃₋₅₂'nin sıçan izole aort halkalarında gevşeme oluşturduğu saptanmıştır (34).

ADM'nin bölgesel vasküler yataklar dışında sistemik vasküler etkileri de çalışılmış ve yanıtların türler arasında belirgin değişiklikler gösterdiği anlaşılmıştır. ADM deney hayvanlarında vazodilatasyon ve hipotansiyona yol açmaktadır. İzole sıçan kalbinde bolus ADM infüzyonu doza bağımlı ve uzun süreli bir koroner vazodilatasyon ile sonuçlanmış ve bu etki CGRP₈₋₃₇ ile azalmıştır (35). Anestezi altındaki sıçanlara akut ya da kronik ADM uygulanması kan basıncında düşme ile birlikte toplam periferik rezistansta anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bu duruma, kalp hızı, kardiyak output ve atım hacminde artma eşlik etmiştir (36, 37). Metoksamin ile önceden kasılmış sıçan mezenterik vasküler yatağına ADM verilmesi perfüzyon basıncı ve arteryel basınçta doza bağımlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bu gevşeme yanıtının CGRP₈₋₃₇ ile azalması mezenterik yatakta ADM'ye gevşeme yanıtının bir kısmında CGRP reseptörlerinin rol oynayabileceğini göstermektedir (38,39). Köpeklerde intrakoroner bolus ADM injeksiyonunun doza bağımlı olarak ve sistemik hemodinamiyi etkilemeden koroner kan akımını artırdığı gösterilmiştir.

Gönüllülere intravenöz ADM infüzyonu arteryel kan basıncında doza-bağımlı bir azalma oluşturmaktadır (40-43). ADM'nin insan koroner arterlerinde güçlü bir gevşetici etkisi olduğu (9, 44) pulmoner dolaşımda hem arter hem de venleri gevşettiği bilinmektedir (31, 45). Sağlıklı gönüllülerde düşük doz (1-3 pmol/kg/dak) ADM infüzyonunun kalp hızını etkilemeksizin kardiyak indeks ve ejeksiyon fraksiyonunu artırdığı, ardyüğü ise azalttığı bildirilmiştir (41). ADM hem sistemik hem de pulmoner dolaşımda güçlü bir arteryel vazodilatör olmasına karşın, fizyolojik düzeylerde, in vivo arteryel tonus üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir.

ADM'nin aracılık ettiği venöz etkiler daha az önem taşımaktadır. ADM in vivo önceden kasılmış insan el dorsal venlerini gevşetmektedir. (46). Kedilerde pulmoner arterlere kıyasla pulmoner venlerde daha düşük bir gevşeme yanıtı oluşturmaktadır (47). Benzer şekilde sıçan mezenterik vasküler yatağının venöz kısmında arteryel kısma göre daha düşük bir gevşeme yanıtı oluşturduğu bildirilmiştir (39).

ADM vasküler endotel hücrelerde Ang II kaynaklı doku faktörü ve plazminojen aktivatör inhibitör tip1'i inhibe eder. Bu mekanizmalar aracılığıyla koagülasyon ve fibrinolitik etkinin düzenlenmesine katkıda bulunabilir (48).

2.1.6.2. Kardiyak Etkileri

Kalbin çok sayıda ADM bağlanma bölgesi içermesi buranın ADM için önemli bir bölge olduğunu düşündürmektedir. Ancak ADM'nin kalpteki fizyolojik rolü tam olarak belirlenememiştir; örneğin, pozitif ya da negatif bir inotrop olup olmadığı henüz kesinleşmiş değildir. ADM'nin tavşan myositleri (49, 50) ve perfüze

sıçan kalbinde (49) negatif inotrop etki oluşturmaya karşın sıçan myositlerinde (51) bir pozitif inotrop olabileceği öne sürülmüştür. İnsanlardaki bulgular ise çelişkilidir. İnsan izole myokard trabekülünde ADM inotropik etki oluşturmamaktadır (52). Diğer taraftan Nagaya ve ark. ADM'nin myokardın oksijen tüketimini artırmaksızın direkt inotropik etki ile kardiyak fonksiyonlarda artma oluşturabileceğini ileri sürmüşlerdir (53).

ADM kardiyak myositlerde protein sentezinde artma ve hipertrofi oluşturmada, kardiyak fibroblastlarda ise ekstrasellüler matris üretimini ve proliferasyonu inhibe etmektedir (18).

2.1.6.3. Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

ADM lokal olarak üretilmesinin yanı sıra kan beyin bariyerinin olmadığı area postrema aracılığıyla dolaşımdan beyne geçerek santral sinir sisteminde etki oluşturabilir. ADM'nin sistemik olarak uygulanmasıyla ortaya çıkan hipotansiyon ve sistemik vasküler rezistansta azalmanın tersine, intraserebroventriküler (i.c.v) uygulanması ile sistemik hipertansiyon görülmektedir. Bilinci açık sıçanlarda ADM'nin santral hipertansif etkilerinin doza bağımlı olduğu ve CGRP₈₋₃₇ ile antagonize edilmediği bildirilmiştir (54). Bir diğer çalışmada ise anestezi altındaki sıçanlara i.c.v ADM uygulanmasının preganglionik sempatik deşarjda artmaya neden olduğu gösterilmiştir (55). Sıçanlarda area postrema'ya ADM mikroenjeksiyonu kalp hızı ve kan basıncında artmaya neden olmaktadır (56).

ADM'nin santral etkileri ile su ve tuz alımını inhibe ettiği ve gastrik motiliteyi azalttığı gösterilmiştir. İntraserebroventriküler ADM uygulanması, Ang II veya tuz iştahıyla oluşan hiperosmolalite ve hipovoleminin neden olduğu su alımını inhibe etmekte, idrar miktarını, idrarla Na⁺ ve K⁺ atılımını artırmaktadır (57). Yine sıçanlarda i.c.v. ADM uygulanmasının doza bağımlı olarak iştahı azalttığı ve bu etkiye kısmen CGRP reseptörlerinin aracılık ettiği bildirilmiştir. Düşük doz ADM iştahı azaltmakta ve kan basıncı üzerinde anlamlı bir etki oluşturmamakta ancak yüksek dozlarda iştah ve su alımının inhibisyonundan çok hipertansiyona neden olmaktadır (17). ADM'nin i.c.v. enjeksiyonu ile kardiyovasküler sistem ve sıvı-elektrolit dengesinde değişiklikler oluşması bu peptidin nöromodülatör veya nörotransmitter doğasına işaret etmektedir. Deneysel çalışmalarda ADM'nin nöronal eksitasyon paternlerinde değişiklik oluşturması da ADM'nin bir nörotransmitter olabileceği fikrini desteklemektedir.

2.1.6.4. Renal Etkileri

Glomerül, distal tübül ve medüller toplayıcı kanallarda üretilen ve ayrıca dolaşım yolu ile böbreğe gelen ADM, böbrek fonksiyonları üzerinde çeşitli etkiler oluşturur. Deney hayvanlarında ADM'nin belirgin diürez, natriürez ve renal vazodilatasyon oluşturduğu saptanmıştır (18). Köpeklerde intrarenal ADM uygulanması ile oluşan diüretik ve natriüretik etkinin glomerül filtrasyon hızında artma ve distal tübül sodyum reabsorpsiyonunda azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. ADM aracılı natriürez, prostaglandin sentezinin inhibisyonu ile tamamen bloke olmaktadır (58). Anestezi altındaki köpeklere ADM uygulanması kalp hızı ve ortalama arteriyel kan basıncını etkilemeksizin renal kan akımını, idrar hacmini, idrarla sodyum atılımını ve glomerül filtrasyon hızını preglomerül ve postglomerül arteriyoller üzerindeki etkisi ile artırmaktadır (59).

2.1.6.5. Pulmoner Etkileri

Kronik i.v. infüzyon veya aerosol ile ADM uygulanması pulmoner vazodilatasyon ile pulmoner arteriyel basıncı azaltmakta ve bunun sonucunda sağ ventrikül hipertrofisi sınırlanmaktadır (41). ADM inhalasyonunun histamin, asetilkolin ve antijenle indüklenen bronkokonstriksiyon ve mikrovasküler göllenmeyi azalttığı ve lipopolisakkaritlere yanıt olarak alveolar makrofajlardan nötrofil kemoatraktanların salınımını inhibe ederek antiinflamatuvar etki oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ADM'nin ana pulmoner surfaktan olan fosfotidilkolin salınmasını uyardığı ve bu şekilde surfaktan oluşumunu modüle ettiği de gösterilmiştir (17).

2.1.6.6. Büyümenin Düzenlenmesi

ADM hücre tipine bağlı olarak hücre proliferasyonunu hem inhibe hem de stimüle edebilir. ADM sıçan kardiyak fibroblastlarında ve mezengial hücrelerde antiproliferatif etki oluşturmakta, vasküler düz kas hücre proliferasyonunda azalmaya ve koroner arter düz kas hücre migrasyonunda inhibisyona neden olmaktadır (17). Mezengial hücrelerde Ang II ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü ile oluşan migrasyon ve proliferasyonu inhibe etmekte ve bu hücrelerde reaktif oksijen metaboliti üretimini azaltarak antioksidan etki oluşturmaktadır (24). ADM, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve endotelin-1 ile stimüle edilen mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyonunu da azaltmaktadır (18).

Diğer taraftan ADM'nin, adrenal korteksin zona glomerulosa hücrelerinde, normal ve malign deri hücrelerinde, osteoblastlarda, insan oral keratinositlerinde ve pek çok tümör hücresinde proliferasyonu stimüle ettiği bildirilmiştir.(15).

2.1.6.7. Hormon Düzenlenmesi

ADM paraventriküler ve supraoptik hipotalamik nöronlarda arginin-vazopressin ve oksitosin salınımını etkiler; santral ADM uygulanması oksitosin salınımını stimüle etmekte, hiperosmolaritenin stimüle ettiği vazopressin sekresyonunu ise inhibe etmektedir. ADM periferik uygulandığında adrenokortikotropik hormon salınımını azaltırken, i.c.v yoldan uygulandığında kortikotrop salgılatıcı hormon üretimini aktive ederek hipotalamus-hipofiz-adrenal aksını stimüle eder (60). ADM'nin aldosteron sekresyonu üzerine etkisi ise tartışmalıdır; hem stimülatör hem de inhibitör etkisi bildirilmiştir. ADM, Ang II ve K⁺ ile uyarılan zona glomeruloza hücrelerinde aldosteron üretimini inhibe etmekte ve Ang II infüzyonu ile oluşan plazma aldosteron seviyelerindeki artışı önlemektedir (61). Buna karşın bazal ve adrenokortikotropik hormon ile stimüle edilen aldosteron sekresyonunu artırabileceği de gösterilmiştir (2, 62). Kortizol ve androjenlerin sentez edildiği zona fasikülata ve zona retikulariste ADM ve reseptörleri çok düşük düzeylerde eksprese edilmektedir ve kortizol sekresyonu üzerinde ADM'nin belirgin bir etkisi bulunamamıştır (63). Diğer taraftan ADM, pankreasta insülin ve amilaz sekresyonunu inhibe etmektedir (64, 65).

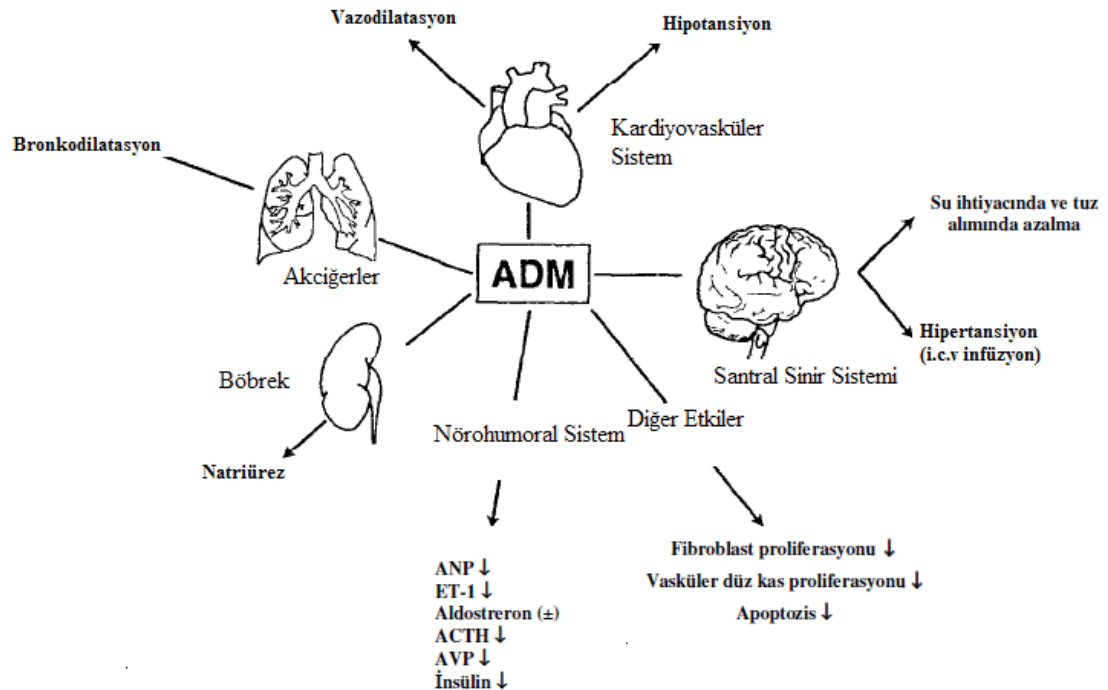
2.1.6.8. Adrenomedullin'in Diğer Fonksiyonları

Kadınlarda üreme sisteminde ADM'nin yüksek miktarlarda bulunması ve menstrual siklus boyunca dalgalanmalar göstermesi üreme fizyolojisinde önemli roller oynadığına işaret etmektedir. ADM uterusu, lokal damarlarda gevşetici etki, düz kas gevşemesi, anjiogenez, antiapoptotik ve antimikrobiyal etki oluşturmaktadır. Ayrıca hamileliğin belirli dönemlerinde kasılmaları azaltarak uterusun sakin kalmasına katkıda bulunur (66). Erkeklerde intrakavernozal enjeksiyonu penis kan akımını artırır ve ereksiyonda artmaya neden olur (67).

ADM'nin organizmanın dış bariyerini oluşturan deri, solunum yolları, genitoüriner sistem, kornea, sindirim borusu gibi epitel yüzeylerde ve ayrıca ter, tükürük, süt vb. koruyucu salgılarda mevcut olması savunma sistemi ile ilgili doku ve sıvılarda, mikrobiyal kolonizasyonlara karşı olası koruyucu bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu görüşü destekler şekilde solunum yolları ve deride sıklıkla bulunan gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi olduğu gösterilmiştir (68).

ADM'nin apoptozu azaltan bir faktör olduğu düşünülmektedir; endotel hücrelerinde ve zona glomerulosa hücre kültürlerinde antiapoptotik etki oluşturduğu bildirilmiştir (69).

ADM kemikte büyüme faktörü gibi etki göstererek osteoblastik aktiviteyi stimüle eder. Bu nedenle osteoporozun tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (70).



Şekil 2.6. ADM'nin Fizyolojik Etkileri

2.1.7. Adrenomedullin ve Klinik

Plazma ADM düzeyleri aşağıda değinilen çeşitli hastalıklar ve klinik durumlarda yükselmektedir.

2.1.7.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Plazma ADM konsantrasyonları primer arteryel hipertansiyonlular ve sol ventrikül hipertrofisi ve nefroskleroz gibi hipertansiyon komplikasyonu olan hastalarda normalden daha yüksek bulunmuştur (71, 72). Deoksikortikosteron asetat ve yüksek sodyum diyeti (DOCA-tuz) uygulanan spontan hipertansif sıçanlarda plazma ADM ve kardiyak ADM mRNA düzeylerinde artma gözlenmiştir (73). Deneysel çalışmalar ciddi hipertansiyon olgularında myokardial yüklenmenin ADM'deki artmanın kaynağı olabileceğini, diğer taraftan orta ya da hafif hipertansiyonda aynı durumun söz konusu olmadığını ileri sürmektedir. Sıçanlarda ventriküler aşırı yüklenmenin derecesinin, kardiyak myositlerde ADM üretimi ile paralel olduğu ve mekanik stresin ADM gen ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (74). ADM kardiyovasküler sistemi basınca bağlı aşırı yükden koruyor gibi görünmektedir. Adenovirüs aracılı ADM gen transfüzyonu ile aşırı ADM ekspresyonunun, Dahl-tuz duyarlı sıçanlarda, spontan hipertansif sıçanlarda, DOCA tuz hipertansif sıçanlar ve Goldblatt hipertansif sıçanlarda renal ve kardiyak hasarı azalttığı gösterilmiştir (17, 18). Hipertansiyonda yükselen ADM düzeyleri natriüretik ve vazodilatör etki ile myokardial yüklenmeyi azaltarak koruyucu rol oynamakta ve bu şekilde myokardial hipertrofiyi de sınırlamaktadır (75).

ADM'nin aterosklerotik plaklarda yer alan makrofajlarda bulunduğu ve ADM düzeylerindeki artmanın arteryel skleroz, karotid arter aterosklerozu ve periferik arter okluzif hastalıklarının şiddetiyle korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle plazma ADM düzeyleri, ilerlemiş arteryel sklerozun takibinde yararlı bir biyomarker olabilir (76). İnflamasyonda ADM üretiminde artma gözlenmekte, artan ADM vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ederek antiaterosklerotik ve anti-inflamatuvar etki oluşturmaktadır. Ayrıca, lipozom ile enkapsüle edilmiş ADM'nin sıçanlarda vasküler kalsifikasyonu azalttığı bildirilmiştir (77).

Akut myokard infarktüsünde plazma ADM düzeyi yavaş ve kararlı bir şekilde yükselir, 2-3 gün sonra maksimum düzeye ulaşır ve yaklaşık 3 hafta sonra bazal seviyeye iner. ADM'deki artmanın kardioprotektif etki gösterdiği, artan ADM'nin myokard hücrelerindeki oksidatif stresi azalttığı ve lokal koroner vazodilatasyon ile myokard iskemisini sınırlandırdığı bildirilmiştir (78). Myokard infarktüslü hayvan modellerinde ADM, CL ve RAMP2 ekspresyonunun arttığı, kan basıncını etkilemeyen düşük dozda kronik ADM infüzyonunun myokard infarktüsünde kardiyak remodelingi inhibe ettiği saptanmıştır (75).

Vazospastik anjina sırasında ADM geninde hipoksi ile indüklenebilen elementlerin aktivasyonu sonucu (79) koroner dolaşımdaki ADM düzeyleri yükselir (80). Akut koroner sendromlu hastalarda perikardial sıvıdaki ADM konsantrasyonu plazmadakinden daha yüksek bulunmuştur (24).

Myokardial iskemi reperfüzyon öncesinde transgenik aşırı ADM ekspresyonu ya da adenovirüs aracılı gen transferi yapılan çalışmalarda ADM'nin süperoksid anyon üretimini, infarkt alanını, ventriküler fibrilasyon sayısını azaltarak ve

apoptozu inhibe ederek kalbi koruduğu bildirilmiştir (18). ADM, Akt-GSK-kaspaz sinyalizasyon yolağı ile iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan kardiomyosit apoptozuna karşı koruyucu etki oluşturmaktadır (81).

Konjestif kalp yetmezlikli hastalarda plazma ADM düzeyinin sağlıklı insanlara göre arttığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur. New York Kalp Birliğı Fonksiyon Klasifikasyonuna göre hastalığın şiddeti arttıkça plazma ADM konsantrasyonu yükselmektedir (82, 83). Bu hastalardaki yüksek peptid düzeyinin negatif prognostik faktör olduğı düşünölmektedir. Kalp yetmezliğinde yüksek plazma ADM düzeylerinin myokardiyal ADM üretimindeki artmaya bağı olabileceğı düşünölmektedir. Kalp yetmezliğı nedeniyle kalp transplantasyonu yapılan alıcılardan elde edilen myokard dokusundaki ADM konsantrasyonunun vericilerdekenden daha yüksek olduğı saptanmıştır (19). Kalp yetmezliğı olan hastaların koroner sinüslerindeki ADM konsantrasyonunun aorttakine göre daha yüksek olması dolaşımdaki ADM havuzuna myokardın katkısını işaret eden bir diğere bulgudur. Kalp yetmezliğı hayvan modellerinde ADM, CL, RAMP2 ve RAMP3 gen ekspresyonunda anlamlı bir artma gözlenmektedir (17). ADM up-regölasyonu kardiyak ön yük ve ard yükün azalmasında kompensatuvar bir mekanizma oluşturabilir. Kalp yetmezlikli hastalara ve sağlıklı gönüllölere sistemik ADM infüzyonu kardiyak indekste artma oluşturmaktadır (42).

ADM ayrıca ekstrasellöler matriks üretimi, myokardiyal fibroblast proliferasyonu ve myosit hipertrofisini azaltarak myokardiyal remodelingi inhibe etmektedir (24).

2.1.7.2. Renal Hastalıklar

ADM'nin hipotansif, vazodilatör, natriüretik ve mezengial hücreler üzerindeki antiproliferatif etkileri nedeniyle renal hastalıklarda önemli bir rol oynadığı düşünölmektedir. Çeşitli glomerulonefrit tiplerinde ve kronik böbrek yetmezliğinde plazma ADM düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (84, 85). ADM'nin kronik glomerulonefritte rolünü belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada IgA nefropatisinde plazma ve idrar ADM düzeyleri ölçölmüştür. ADM düzeyleri plazmada yüksek bulunurken idrarda düşük olarak belirlenmiş, serum kreatinin düzeyleri ve fraksiyone sodyum atılımı ile plazma ADM düzeyi arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Yüksek plazma ve düşük idrar ADM düzeylerinin hastalığın fizyopatolojisi ile ilişkili olduğı öne sürölmüştür (85). Renal fonksiyon bozukluğı olan hipertansiyonlu sıçanlarda yapılan bir diğere çalışmada ise kronik ADM uygulamasının ortalama arteriyel basıncı azaltmaksızın renal fonksiyonları düzelttiğı, plazma renin, aldosteron ve renal doku Ang II düzeylerindeki artmayı anlamlı olarak inhibe ettiğı saptanmıştır. Ayrıca ADM infüzyonu renal kortekste tümör büyüme faktörü-beta ve anjiotensin dönüştürücü enzim mRNA ekspresyonundaki artmayı da azaltmıştır (86). Bu sonuçlar ADM düzeylerindeki artmanın kronik hipertansif glomerulosklerozda kompensatuvar bir rol oynayabileceğine ve uzun dönem ADM infüzyonunun bu tip hipertansiyon modellerinde renoprotektif etkiler oluşturabileceğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, DOCA-tuz hipertansif sıçanlara insan ADM gen transferi, kan basıncında uzun süreli bir azalma ve renal fonksiyonlarda düzölme oluşturmaktadır. ADM gen aktarımı glomerular skleroz, tubuler hasar, üriner protein kaybı ve interstisyel fibrozu azaltmaktadır (87).

ADM'nin renoprotektif etkisinin reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılanması aracılığı ile gerçekleştiği ileri sürülmektedir. ADM'nin mezengial hücre migrasyonu ve proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkileriyle kronik nefropati gelişimini yavaşlatabileceği ve immün zedelenme ve inflamatuvar reaksiyonlara karşı glomerül üzerinde koruyucu bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (88).

2.1.7.3. Septik Şok

Plazma ADM düzeyleri sepsis ve septik şokta oldukça artmaktadır (89). Bakteriyel endotoksinler ve proinflamatuvar sitokinlerin in vivo ve in vitro pek çok dokuda ADM gen ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. ADM'nin septik şok ile ilişkili hipotansiyon ve vazodilatasyona katkıda bulunduğu öne sürülmektedir. ADM damarlar üzerindeki gevşetici etkisinin yanı sıra damar duvarında sitokinle indüklenen indüklenebilir nitrik oksid sentazın (iNOS) gen ekspresyonunu artırmaktadır (24). ADM reseptör antagonisti ADM₂₂₋₅₂'nin sıçanlarda LPS ile oluşturulan hipotansiyonu önlediği, anti-ADM antikörlerin kolonik ligasyon ve perforasyon ile oluşturulan polimikrobiyal sepsis modelinde hipotansiyonu azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte yeni çalışmalar ADM'nin septik şok patofizyolojisinde daha karmaşık bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. ADM'nin bakterisidal, antiinflamatuvar ve lokal vazodilatör etkisi ile dokuların hipoksik hasarını sınırlayarak sepsiste yararlı olabileceği düşünülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında transgenik aşırı ADM ekspresyonu olan farelerde LPS, daha düşük düzeyde hemodinamik ve inflamatuvar değişiklikler, karaciğer hasarı ve mortalite oluşturmaktadır (90). ADM'nin santral hipertansif etkilerinin sepsis sırasında karşılaşılan kardiovasküler kollapsa karşı koruyucu bir rol oynayabileceği de düşünülebilir, ancak santral ADM uygulanması ile kardiovasküler parametreler arasındaki ilişkinin tamamen ortaya konulabilmesi ve ADM'nin bu süreçteki fizyolojik rolünün ve beyinde ADM transkripsiyonunu düzenleyen faktörlerin belirlenebilmesi için ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

2.1.7.4. Diyabet

ADM'nin pankreasın langerhans adacıklarında bulunduğu ve insülin sekresyonu üzerinde inhibitör etkisi olduğu çeşitli deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (64, 91). İzole sıçan pankreas adacıklarına ADM eklenmesi, insülin sekresyonunda doza-bağımlı bir azalmaya sonuçlanmaktadır. İlginç olarak ortamda ADM'ye karşı bir monoklonal antikör bulunması, insülin sekresyonunda beş katlık bir artışa neden olmaktadır. Dolayısıyla adacıklardan salgılanan ADM'nin, β hücre fonksiyonlarını aktif bir şekilde inhibe ettiği düşünülmektedir. ADM ile oluşan kan insülin düzeylerindeki azalmaya glukoz düzeylerindeki artma eşlik eder. Diyabetik sıçanlara ADM'ye karşı geliştirilen monoklonal antikörler enjekte edildiğinde glisemi normal düzeye düşmektedir (18). Yeterli bir şekilde kontrol altına alınamamış diyabetik hastalarda plazma ADM düzeylerinin yükseldiği, ayrıca hipergliseminin sıçan vasküler düz kas hücre kültürlerinde ADM ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (92). Diğer taraftan, plazma glukoz ve hemoglobin A1c düzeyi yüksek olan diyabetik hastalar (diyabetik nefropatisi olanlar dışında) ile sağlıklı kişilerin plazma ADM düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (93). Ayrıca plazma ADM düzeyleri renal yetmezliği olan tip I diyabetik hastalarda diğer komplikasyonlu diyabetik hastalara oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu durum

renal komplikasyonlu hastalarda afferent arterioller ve glomerul kapillerinde ADM ve RAMP2 ekspresyonu artması ile açıklanmaktadır (94).

2.1.7.5. Kanser

ADM ilk olarak insan adrenal tümör ektresinden elde edilmiş, daha sonra çeşitli nöronal ve epitel kanserlerde de lokalize olduğu saptanmıştır. Akciğer ve gastrointestinal kanserli olgularda plazma ADM düzeylerinde artma bildirilmiştir. Akciğer kanseri ve normal akciğer örnekleri arasında yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, ADM ekspresyonundaki artmanın bu hastalar için bir marker olabileceği ileri sürülmüştür.

ADM tümör hücreleri için yaşamsal bir faktör olabilir; bir multifonksiyonel düzenleyici peptid olarak görev yaparak bazı tümör hücrelerinin fizyolojisini değiştirip malign büyümeye katkıda bulunabilir. Hipoksik koşullarda ADM düzeylerinde yükselme gözlenir. Solid tümörlerin mikroçevresinde hipoksi oluşur ve tümör hücreleri, yaşamak için kan damarlarının büyümesini, protein ürünlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu ve diğer yaşamsal stratejileri stimüle eder (18). İn vitro deneylerle ADM'nin proliferatif aktivitesi gösterilmiş, meme kanseri hücrelerine anti-ADM monoklonal antikoları eklendiğinde hücre proliferasyonunda belirgin bir azalma olduğu ve bu etkinin ekzojen ADM eklenmesi ile tersine döndüğü bildirilmiştir. Bu bulgular hücre kültürlerindeki diğer çalışmalarla da desteklenmiştir (15).

2.2. Düz Kasta Eksitasyon Kontraksiyon Kenetlenme Mekanizması

Fizyolojik koşullarda iskelet kasının kasılabilmesi için kas hücre membranının aksiyon potansiyeli şeklinde depolarize olması gerekir. Membran depolarizasyonu sonucu kasılmanın gerçekleşmesi olayına '*elektromekanik kenetlenme*' denir. Çizgili kas kasılmasında elektromekanik kenetlenme olabilmesi için mutlaka aksiyon potansiyeli şeklinde hızlı bir potansiyel değişimine gereksinim vardır. Düz kasta ise aksiyon potansiyeli yapmayacak kadar zayıf depolarizasyon dalgalanmaları da yavaş bir şekilde kasılmayı oluşturabilir. Düz kasın kasılabilmesi (sarkoplazmik kalsiyum düzeyinin belirli bir eşik değeri üzerine yükselebilmesi) için mutlaka depolarizasyon olması gerekmez; bu kaslar depolarizasyon olmaksızın da fizyolojik etkenler (nöromediyatörler, hormonlar ve otakoidler gibi) tarafından kasılabilirler. Düz kas hücresinin fizyolojik etkenler ve onların etkisini taklit eden ilaçlar tarafından depolarizasyon meydana gelmeksizin kasılmasına '*farmakomekanik kenetlenme*' denir (95).

Tüm kaslarda depolarizasyon aracılığıyla ya da kontraktil bir agonistle uyarı sonucu kasılmanın oluşabilmesi esas olarak serbest kalsiyum iyonlarının intraselüler konsantrasyonundaki artmaya bağlanmaktadır (96). Düz kasın eksitasyonundan sonra ortaya çıkan intraselüler kalsiyum konsantrasyonundaki artma miyozin hafif zincir kinaz (MHZK) enzimini aktive eden kalsiyum-kalmodulin kompleksinin oluşumuna yol açar. MHZK miyozinin hafif zincirini fosforile eder ve miyozin başlarındaki ATPaz aktivasyonu sonucu aktin ile miyozin arasında çapraz köprü oluşur. Çapraz köprülerin kırılıp yeniden oluşumu ile kasılma başlar. Kalsiyum iyonunun sarkoplazmada kritik bir düzeyin altına düşmesi ile miyozin fosfataz enzimi aktive olur. Miyozin fosfataz enzimi fosforile edilmiş düzenleyici miyozin hafif zincir molekülünden fosfat gruplarının koparılmasında (defosforilasyon) rol oynar.

Defosforilasyon sonucu çapraz köprüler ile aktin arası etkileşme inhibe olur ve gevşeme meydana gelir (95, 96).

Hücre içi kalsiyumdaki artış farmako ve elektromekanik kenetlenme sırasında farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Kontraktıl bir agonistin reseptörüne bağlanması ile başlayan farmakomekanik kenetlenme daha sonra membrana bağlı guanin nükleotid düzenleyici proteinler (G proteinler) aracılığı ile fosfolipaz C enzimi aktivasyonu ile sonuçlanır. Fosfolipaz C ile membran fosfolipidlerinden fosfotidil inozitol-4,5-bifosfat'dan inozitol-1,4,5-trifosfat ve diaçilgliserol oluşur. İnozitol-1,4,5-trifosfat sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesine neden olur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda hızlı bir artma gerçekleşir ve kasılma başlar. Diaçilgliserol ise protein kinaz C'yi aktive ederek etkinin devam etmesinde rol oynamaktadır. Farmakomekanik kenetlenme sırasında intraselüler kalsiyum yüksekliğinin devamından sorumlu olan diğer bir olay, reseptörle düzenlenen kalsiyum kanalları aracılığı ile kalsiyumun içeri girmesidir. Hücre içi kalsiyumdaki artma ile büyük kondüktanslı kalsiyumla aktive edilen potasyum kanalları (BK_{Ca}) aktive olur. Gerçekleşen hiperpolarizasyon agonistle oluşan kasılmayı önlemeye meyillidir ancak BK_{Ca} kanallarının G proteini kenetli inhibisyonu ile bu mekanizma önlenmektedir.

Elektromekanik kenetlenme sırasında ise ekstraselüler potasyum konsantrasyonundaki artış ile meydana gelen hücre depolarizasyon kalsiyumun hücre içine girişini tetikleyen dihidropiridin-duyarlı voltajla düzenlenen kalsiyum kanallarını açmaktadır. Bu ise kasılma için gerekli Ca^{+2} 'un sarkoplazmik retikulumdan salıverilmesini sağlamaktadır (95).

2.3. Adrenomedullin'in Vasküler Düz Kas Gevşetici Etkisinde Rol Oynayan Mekanizmalar

ADM'nin vasküler düz kas gevşetici etkisinde rol oynayan mekanizmalar aşağıda özetlenmiştir.

2.3.1. sAMP Yolağı

CGRP, vazoaktif intestinal peptid, prostaglandin E1 gibi pek çok gevşetici madde düz kas zarı üzerinde kendilerine özgü reseptörlere bağlandıktan sonra stimülatör G proteini aracılığı ile adenilat siklazı aktive ederek sAMP üretir. Oluşan sAMP, protein kinaz A (PKA)'yı aktive ederek fosforile olabilen proteinler üzerinde düzenleyici etki oluşturur. Bu proteinlerden biri olan fosfolamban, normalde kalsiyumun sarkoplazmik retikulumda kalmasını sağlayan kalsiyum pompasını inhibe eder. PKA tarafından fosforlanması, kalsiyum pompası üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırıp hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalmasına ve bu şekilde gevşemeye neden olur (97).

sAMP'deki artmanın bir diğer etkisi PKA aracılığı ile potasyum kanallarının açılmasıdır. Normalde hücre dışına oranla hücre içinde potasyum konsantrasyonu yüksektir. Potasyum kanallarının açılması potasyumun hücre dışına çıkışına ve bu şekilde hücrenin hiperpolarizasyonuna neden olur. Bu hiperpolarizasyon, depolarizasyon ile açılan, hiperpolarizasyon ile kapanan L-tipi kalsiyum kanallarının kapanmasını sağlayarak hücre içi kalsiyumun azalmasına ve düz kasın gevşemesine neden olur.

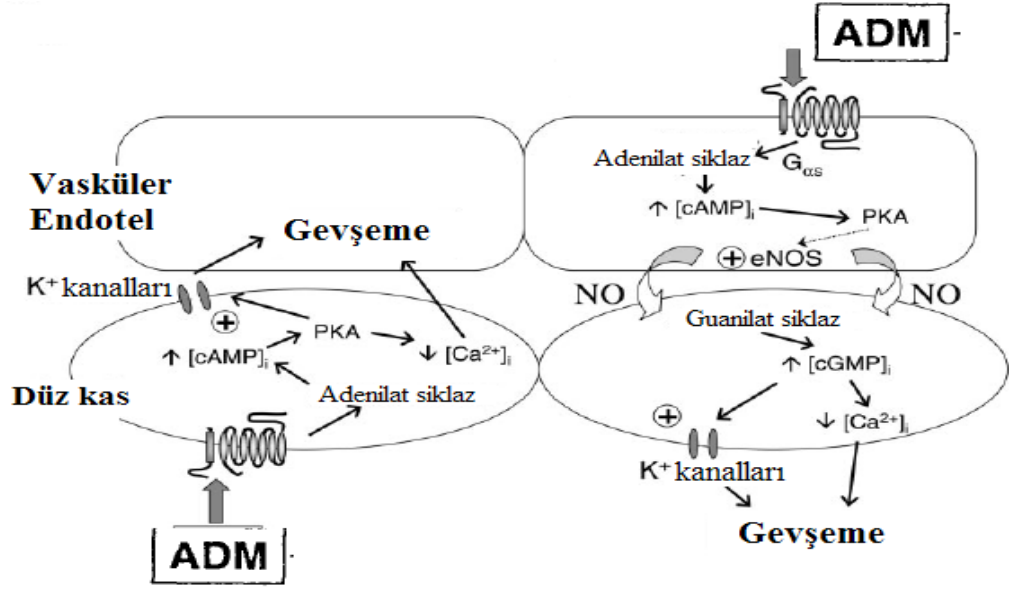
ADM'nin hücre içi sAMP düzeylerini artırıcı etkisi pek çok dokuda gözlenmiş (1, 5, 7) ve sAMP bağımlı PKA aktivasyonunun ADM ile oluşan gevşemede rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (98). Sığır aortik endotel hücrelerinde ADM'nin intrasellüler kalsiyumda sAMP bağımlı bifazik bir artma oluşturduğu, başlangıçta intrasellüler depolardan olan geçici artmayı plazma membranındaki iyon kanalları aracılığıyla olan geçişin izlediği ve bu iki olayda sAMP, sGMP, NO, inozitoltrifosfat ve fosfolipaz C'yi içeren bir dizi intrasellüler ikincil ulak sistemin rol oynadığı bildirilmiştir (8).

2.3.2. NO ve sGMP yolağı

NO endotelden salgılanan gevşetici faktörlerden en önemlisi olup damar tonusunun düzenlenmesinde ve inflamatuvar olayların modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. NO yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arginin'den organizmada geniş bir dağılımı olan NOS enzim grubu aracılığı ile sentezlenir. NOS'un yapısal (cNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere temel olarak iki formu bulunmaktadır. Yapısal NOS ise başlıca iki grup altında toplanmaktadır. Bunlar endotel hücrelerdeki endotelial NOS (eNOS) ve nöral dokuda lokalize olmuş nöronal NOS (nNOS)'dur. İnflamasyonun olmadığı durumlarda yapısal olarak eksprese edilirler. nNOS, beyin, serebellum ve nöroblastlarda bulunur ve NO'nin nörotransmitter rolünde görev alır. Endotelde yer alan eNOS aktivitesi hücre içindeki Ca^{+2} miktarı ile kontrol altında tutulmaktadır. İntrasellüler Ca^{+2} düzeyinin artması ile aktive edilir. Yapısal NOS formları genel olarak iNOS'a göre daha az miktarda (pmol düzeyinde) NO üretirler. iNOS başlıca makrofajlarda bulunmasına karşın, damar düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, Kupffer hücreleri ve endotel hücrelerinde de tespit edilmiştir. NOS'un bu formu etkinleşmek için Ca^{+2} ve kalmoduline ihtiyaç duymamaktadır. İnflamasyon gibi durumlarda eksprese edilen iNOS, inflamasyonda anahtar bir rol oynar. İnflamatuvar sitokinler ve endotoksinlerle karşılaşma sonrasında birçok doku ve hücre tipinde indüklenmekte ve kısa sürede aşırı miktarda (nmol düzeyinde) NO salınımına neden olmaktadır.

Biyolojik yarı ömrü oldukça kısa (2-10 sn) olan NO'nin insan fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir yeri vardır. NO vasküler düz kas gevşemesi, trombosit aktivasyonu, adezyon ve agregasyonun inhibisyonu, endotel ve damar düz kas hücrelerinde proliferasyonun önlenmesi gibi pek çok olayda rol oynamaktadır. NO'nin vasküler sistemdeki gevşetici etkisinin guanilat siklaz aktivasyonu ile sGMP oluşumunu hızlandırmak yolu ile gerçekleştiği bilinmektedir. Damar endotel hücrelerinden salınan NO, guanilat siklaz aracılığı ile sGMP düzeyini artırır. sGMP düzeyindeki artma hücre içine kalsiyum girişini azaltırken hücre dışına kalsiyum atılımını artırır. Ayrıca, sarkoplazmik retikuluma giren kalsiyum miktarını artırarak hücre içindeki kalsiyumun azalması ile damar düz kasında gevşemeye neden olur. NO sentezi L-arginin analogları olan N^w -nitro-L-arginin (L-NA), N^w -nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), N^w -monometil-L-arginin (L-NMMA), N^w -iminoetil-L-ornitin (L-NIO) gibi NOS inhibitörleri tarafından önlenir (99).

ADM'nin vasküler gevşetici etkisinde NO-bağımlı mekanizmaların rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (Şekil 2.7) (34, 100-102).



Şekil 2.7. ADM'nin Endotel Bağımsız (sol taraf) ve Endotel Bağımlı (sağ taraf) Vazodilatör Etki Mekanizması

2.3.3. Potasyum kanalları

Potasyum kanalları kalp atım hızının düzenlenmesi, kas kasılması, nörotransmitter salınımı, nöronal eksitabilite, insülin sekresyonu, epitelyal elektrolit transportu, hücre volümünün düzenlenmesi ve hücre proliferasyonu gibi değişik fizyolojik süreçlerde kritik rol oynayan membran proteinlerinin bir ailesidir (103). Değişik rollere sahip oldukça farklı tipte potasyum kanalları bulunmaktadır.

ATP'ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanalları insülin sekresyonunun düzenlendiği pankreatik β hücrelerinde tanımlanmalarının ardından düz kaslar ve çeşitli nöronları da içeren değişik dokularda da belirlenmişlerdir. K_{ATP} kanalları voltaj ve hücre içi kalsiyum düzeylerinden çok az etkilenmesine karşın temel olarak hücre içi ATP/ADP oranı ile düzenlenmektedir. Hücre içi ATP düzeyi fizyolojik aralıkta (C_{50} : 10-100 μ M) ise bu kanallar kapalıdır. Hücre içi ATP düzeyi bu aralığın altına düşünce aktivasyon gerçekleşir. Bu tip kanallar glibenklamid gibi sülfonilüre içeren bileşik ile selektif olarak bloke edilmekte, kromakalim, lemakalim gibi potasyum kanal açıcıları tarafından aktive edilmektedir.

Kalsiyumla aktive edilen potasyum (K_{Ca}) kanalları iletkenliği büyük (150-250 pikosiemens pS; BK_{Ca}) ve iletkenliği küçük (20-40 pS; SK_{Ca}) olan potasyum kanalları olmak üzere iki çeşittir. Altı transmembranal segment ve bir por oluşturan bölge içeren α , ve iki transmembranal bölge içeren β -alt ünitelerinden oluşmaktadır. Bu kanalların aktivasyonu hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artma ve hücre membranının depolarizasyonu ile ilişkilidir. K_{Ca} kanallarının aktivasyonu voltaj duyarlı kalsiyum kanallarını kapatan ve kalsiyum girişini azaltan dışa doğru potasyum hareketine neden olur. Bunun sonucunda membran hiperpolarize olur ve gevşeme yanıtı oluşur. Bu nedenle K_{Ca} kanalları kontraksiyon ve depolarizasyonu sınırlamada negatif feedback mekanizması olarak anahtar rol oynamaktadır. Bal arısı toksini olan apamin SK_{Ca} kanallarının, akrep zehiri bileşenlerinden karibdotoksin ve iberiotoksin ise BK_{Ca} kanallarının selektif blokörleri olarak kullanılmaktadır (104).

Membran potansiyelindeki değişikliğe yanıt olarak voltajla aktive edilen potasyum (K_v) kanalları 4 adet α ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ ve $K_v1.5$) ve 4 β -alt ünitesinden ($K_v \beta1$, $\beta2$, $\beta3$, $\beta4$) oluşmaktadır. Bu kanallar, kalsiyumdan bağımsız voltaja duyarlı potasyum kanallarıdır. Sadece 20mV'un üzerinde membran depolarizasyonu kanalı aktive eder ve gecikmiş dışa doğru potasyum akımı gerçekleşir. 4-aminopiridin (4-AP) K_v kanal inhibitörü olup bu tip kanal araştırmaları için uygun bir farmakolojik ajandır. K_v kanalları, intraselüler kalsiyum konsantrasyonu ve membran kalsiyum kanal aktivitesinin kontrolüyle düz kas uyarılabilirliğini sağlayan önemli bir potasyum kanalıdır (103).

ADM'nin insan koroner arteriyollerindeki gevşetici etkisinde potasyum kanallarının rol oynadığı bildirilmiştir (9). Köpek koroner vasküler yatağında (10) ve sıçan serebral arteriyollerinde (11) ADM ile oluşan gevşemeye K_{ATP} kanallarının aracılık ettiği, K_{ATP} kanal blokörü uygulaması ile ADM'ye bağlı gevşeme yanıtlarının bloke edildiği gösterilmiştir.

2.3.4. Prostaglandinler

Prostaglandinler ve lökotrienler lipid kökenli otakoidler olup "eikozanoidler" olarak isimlendirilmektedir. Vücutta "lokal hormon" olarak etki gösteren bu yağ asidi türevlerinin biyosentezi araşidonik asidin hücre membranındaki fosfolipidlerden fosfolipaz A_2 enzimi aracılığı ile mobilize edilmesine veya salınımına bağımlıdır. Araşidonik asidin siklooksijenaz yolağına girmesi ile prostaglandinler, lipooksijenaz yolağına girmesi ile lökotrienler oluşur. Bu eikozanoidler vücutta tüm doku ve sıvılarda yaygın olarak bulunur ve inflamasyon, düz kas tonusu, hemostaz, trombosit fonksiyonu, böbrek su-tuz dengesi, uterus aktivitesi, endokrin, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sekresyon gibi bir dizi fizyolojik ve patolojik olayda rol alırlar. Prostaglandin E'ler ve prostasiklin güçlü vazodilatör etkinlik gösterirler. Prostrasiklinler tüm damar yataklarında vazodilatasyon yaparlar ve kan basıncını düşürürler. Prostaglandin E_1 burun mukozasında vazokonstriksiyon yapar, fakat bu maddenin memelilerde damarlarda oluştuğu kanıtlanmamıştır. Prostaglandin E_2 akciğerden geçerken önemli derecede inaktive edildiğinden intravenöz verildiğinde hipotansif etki gücü prostasikline göre 4-8 kez daha düşüktür. İntraarteryel olarak verildiğinde ise bu iki maddenin etki gücü birbirine yakın olarak bulunmuştur. Prostaglandin E_2 ve prostasiklinlerin vazodilatör etkileri esas olarak arteriyolleri ve prekapiller sfinkterleri genişletmelerine bağlıdır. Prostrasiklin ve prostaglandin E_2 adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini inhibe ederek indirekt vazodilatör etki de meydana getirebilirler (105).

ADM-aracılı etkilerin bir kısmında prostaglandinlerin rol oynayabileceği bildirilmiştir. Köpeklerde ADM ile oluşan renal vazodilatasyon ve natriürezde (58) ve sıçan pulmoner arterlerinde ADM'nin oluşturduğu gevşeme yanıtlarında (106) prostaglandinlerin rol oynadığı saptanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Dokunun Elde Edilişi

Kalp-damar cerrahisinin rutin koroner arter by-pass grafiti cerrahisi sırasında kullandığı insan internal torasik arterinden (ITA) artan (redundant) damar örneği 4°C'deki %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışımı ile tamponlanmış fizyolojik tuz solüsyonuna (PSS) konularak hızlı bir şekilde laboratuvar ortamına taşındı. Artere zarar verilmeden etrafındaki bağ dokusu temizlendikten sonra 3-4 mm genişliğinde halkalar şeklinde kesildi. Hazırlanan preparatlar, içerisinde PSS bulunan (mM: NaCl 118, KCl 5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 ve glukoz 11.2) 20 ml'lik organ banyolarına asıldı. Banyolardaki solüsyonun ısı sürekli ölçüm yapan bir termometre aracılığıyla 37°C olacak şekilde sabit tutuldu. Solüsyon pH'sı 7.4 olacak şekilde %95 O₂-%5 CO₂ ile deney boyunca gazlandırıldı. ITA halkaları daha önceden belirlenen 2 g istirahat gerilimi altında her 15 dakikada bir yıkanarak 60 dakika boyunca dinlendirildi. ITA yanıtları bilgisayar bazlı bir veri toplama sistemine (IOX-base-4, EMKA Ltd.) bağlı izometrik transdüserler (IT1-25, EMKA Ltd.) aracılığıyla kaydedildi. İlaç konsantrasyonları banyo solüsyonunda oluşan molar konsantrasyonları olarak ifade edildi.

3.2. Deney Protokolü

Deneyler endoteli sağlam ve zedelenmiş ITA halkalarında gerçekleştirildi. Endotel sağlamlığı 1 saatlik dinlenme periyodundan sonra submaksimal konsantrasyonda (10⁻⁶ M) fenilefrinle kasılan dokuların 10⁻⁶ M asetilkoline gevşeme yanıtlarına bakılarak test edildi. Asetilkoline %60 ve üzeri gevşeme yanıtı veren dokuların endoteli sağlam kabul edildi. Endoteli zedelenmiş halkalar elde etmek için ise, halkaların intimal yüzeyi ucuna pamuk sarılmış ince bir pensetle hafifçe ovuşturuldu. Endotel hasarı fenilefrin (10⁻⁶ M) ile kasılmış dokularda asetilkolinin (10⁻⁶ M) gevşeme yanıtı oluşturmaması ile teyid edildi.

ITA halkalarına önceden 10⁻⁶ M fenilefrin verilerek submaksimal kasılma yanıtı elde edildi. Kasılma yanıtı platoya ulaştığında kümülatif uygulanan ADM'nin (10⁻¹⁰ – 10⁻⁷ M) konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları kaydedildi. Daha sonra dokular NOS blokörü L-NAME (10⁻⁴ M) ile 20 dakika, siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10⁻⁵ M) ile 20 dakika, spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ (5x10⁻⁵ M) ile 20 dakika, K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10⁻⁵ M) ile 30 dakika, K_V kanal blokörü 4-AP (5 mM) ile 10 dakika, BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin (10⁻⁷ M) ile 30 dakika, SK_{Ca} kanal blokörü apamin (10⁻⁷ M) ile 30 dakika, karibdotoksin (10⁻⁷ M) + apamin (10⁻⁷ M) ile 30 dakika ve putatif ADM reseptör antagonisti ADM₍₂₂₋₅₂₎ (10⁻⁷ M) ile 20 dakika inkübe edildikten sonra fenilefrinle kasılmış ITA halkalarında ADM konsantrasyon yanıt eğrileri tekrar elde edildi ve bu şekilde ADM'nin vazodilatör etkisinde prostanoidlerin, NO'nun ve spesifik potasyum kanallarının rolleri değerlendirildi.

Deneylerde kullanılan maddelerin çözücüleri kullanılarak damar yanıtlarındaki temporal değişiklikler incelendi. Deneyler arasında dokular 60 dakika

dinlendirildi. Yukarıda belirtilen deney aşamalarının herbiri için 6-10 ITA preparatı kullanıldı.

3.3. Deneylerde Kullanılan İlaçlar

Deneylerde kullanılan fenilefrin, asetilkolin, L-NAME, indometazin, glibenklamid, 4-AP, apamin ve PSS için gerekli kimyasal maddeler Sigma kimyasal'dan (St. Louis, Mo.), adrenomedullin, ADM₍₂₂₋₅₂₎, ODQ, karibdotoksin ise AnaSpec firmasından (San Jose, CA) elde edildi. Fenilefrin, asetilkolin, L-NAME, 4-aminopiridin, apamin, adrenomedullin, ADM₍₂₂₋₅₂₎, karibdotoksin distile suda, indometazin etanolde, glibenklamid ve ODQ dimetilsülfoksit içerisinde çözüldü.

3.4. İstatistiksel Analiz

Tüm değerler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. EC₅₀ değerleri lineer regresyon analizi ile maksimum yanıtın (E_{max}) %50'sini oluşturan agonist konsantrasyonu olarak hesaplandı. Duyarlılık pD₂ (-Log EC₅₀) olarak verildi. Sonuçların istatistiksel analizi Student t-testi, tekrarlayan ölçümler için ANOVA ve posthoc testler kullanılarak yapıldı. p değerleri 0,05'in altında bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

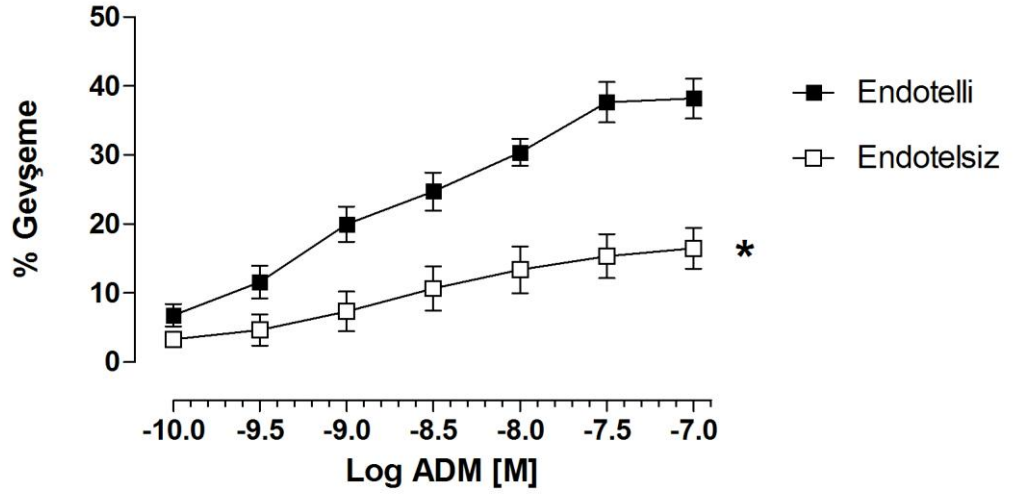
BULGULAR

Submaksimal konsantrasyonda uygulanan fenilefrin (10^{-6} M) ile ITA halkalarında oldukça stabil ve sürekli kasılma yanıtları oluştu. Ön deneylerde, çalışmada kullanılan konsantrasyonlarda ADM'nin, potasyum kanal blokörleri, ODQ, indometazin ve L-NAME'nin insan ITA halkalarında bazal tonus üzerinde anlamlı bir etkilerinin olmadığı saptandı.

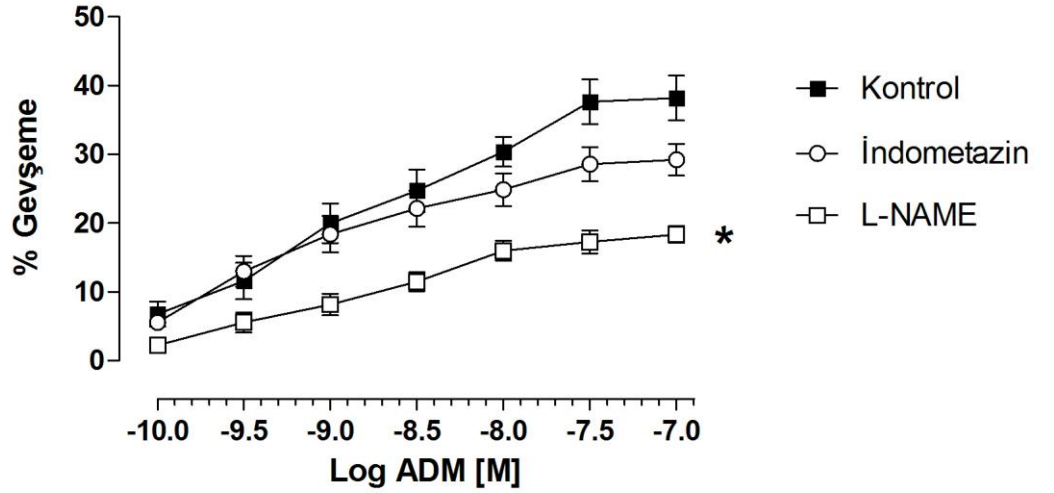
Fenilefrin ile önceden kasılmış insan ITA halkalarında ADM (10^{-10} - 10^{-7} M) konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturdu. ADM'nin gevşetici etkisi endoteli sağlam ITA halkalarında, endoteli zedelenmiş ITA halkalarına göre anlamlı olarak ($p<0,05$) daha yüksek bulundu (Şekil 4.1). ADM'nin endoteli sağlam ve zedeli ITA halkalarında E_{max} değerleri sırasıyla $\%38,0 \pm 2,1$ ve $\%16,4 \pm 2,1$, pD_2 değerleri ise $8,72 \pm 0,18$ ve $8,63 \pm 0,41$ olarak bulundu.

Dokuların 20 dakika süreyle siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) ile inkübasyonu ADM'ye gevşeme yanıtlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, NOS blokörü L-NAME (10^{-4} M) ile inkübasyonu ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir azalma ile sonuçlandı (E_{max} : $\%18,4 \pm 1,0$) (Şekil 4.2). Spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ (5×10^{-5} M) (E_{max} : $\%18,1 \pm 0,7$) ve putatif ADM reseptör antagonisti ADM₍₂₂₋₅₂₎ (10^{-7} M) (E_{max} : $\%12,5 \pm 1,2$) ADM'ye gevşeme yanıtlarında anlamlı (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$) bir azalma oluşturdu (Şekil 4.3 ve 4.4).

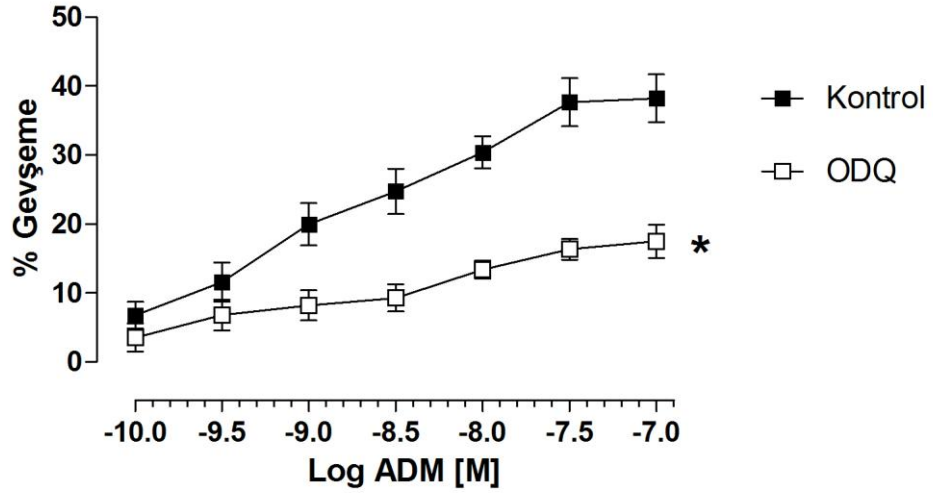
İnsan ITA halkalarının 10 dakika süre ile K_V kanal blokörü 4-AP (5 mM) ya da 30 dakika süre ile K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M) ile inkübasyonu ADM'nin gevşetici etkisinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.5). Diğer taraftan BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M) (E_{max} : $\%18,8 \pm 2,7$) veya SK_{Ca} kanal blokörü apamin (10^{-7} M) (E_{max} : $\%18,1 \pm 4,1$) ile 30 dakika inkübasyon sonrasında fenilefrin ile önkasılma yapılan ITA halkalarının ADM'ye gevşeme yanıtlarında anlamlı (her ikisi için $p<0,05$) bir azalma olduğu saptandı. Dokuların BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M) ve SK_{Ca} kanal blokörü apamin (10^{-7} M) kombinasyonu ile 30 dakika süre inkübasyonu, ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında daha belirgin (E_{max} : $\%13,9 \pm 1,4$) ($p<0,01$) bir inhibisyon oluşturmasına karşın kombinasyonun inhibitör etkisi tek başına karibdotoksin veya apaminin inhibitör etkileri ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 4.6).



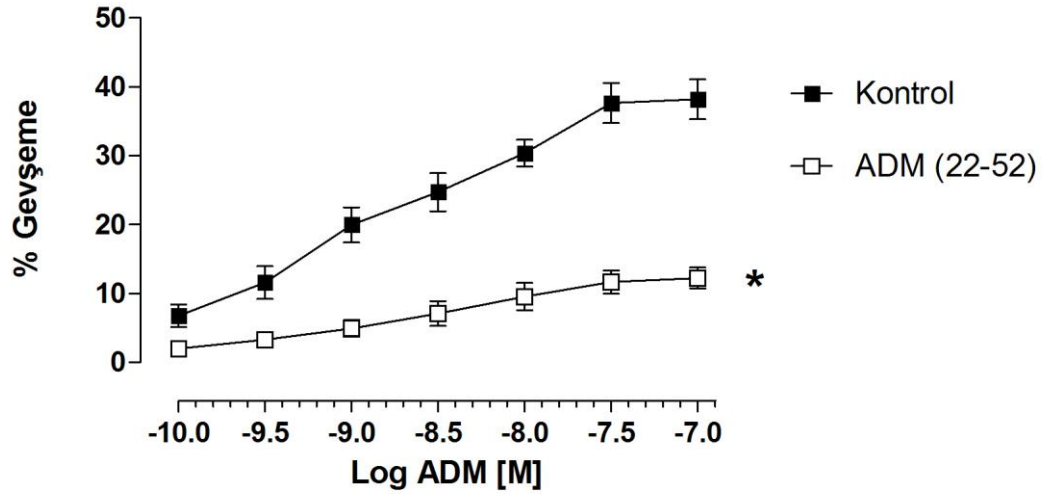
Şekil 4.1. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam (■) ve zedeli (□) insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları (*: $p < 0,05$ endoteli grup ile karşılaştırıldığında. $n=10$, her iki grup için). Sonuçlar submaksimal fenilefrin ile oluşan maksimum kasılmanın % gevşemesi olarak verilmiştir.



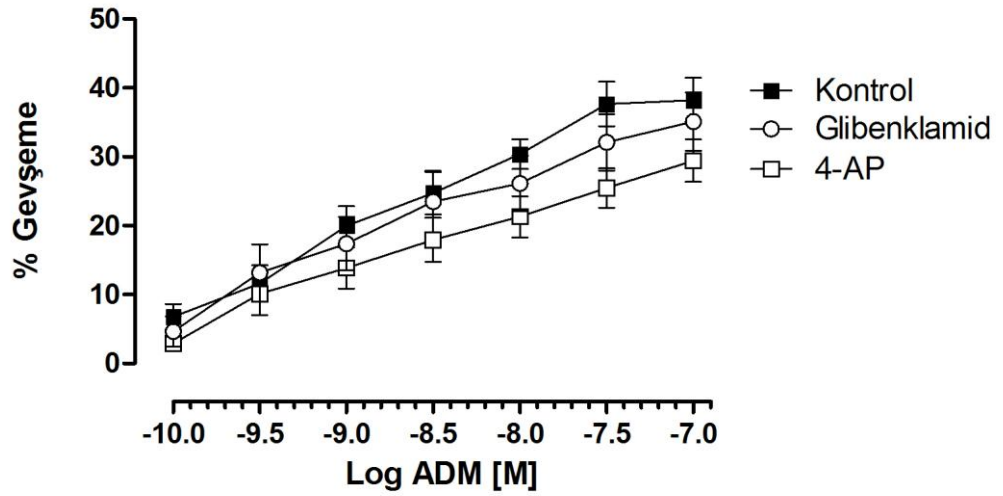
Şekil 4.2. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam (■) insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, $n=8$) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M, 20 dk., $n=8$) ve nitrik oksid sentaz blokörü L-NAME (10^{-4} M, 20 dk., $n=7$) inkübasyonunun etkisi. (*: $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) Sonuçlar submaksimal fenilefrin ile oluşan maksimum kasılmanın % gevşemesi olarak verilmiştir.



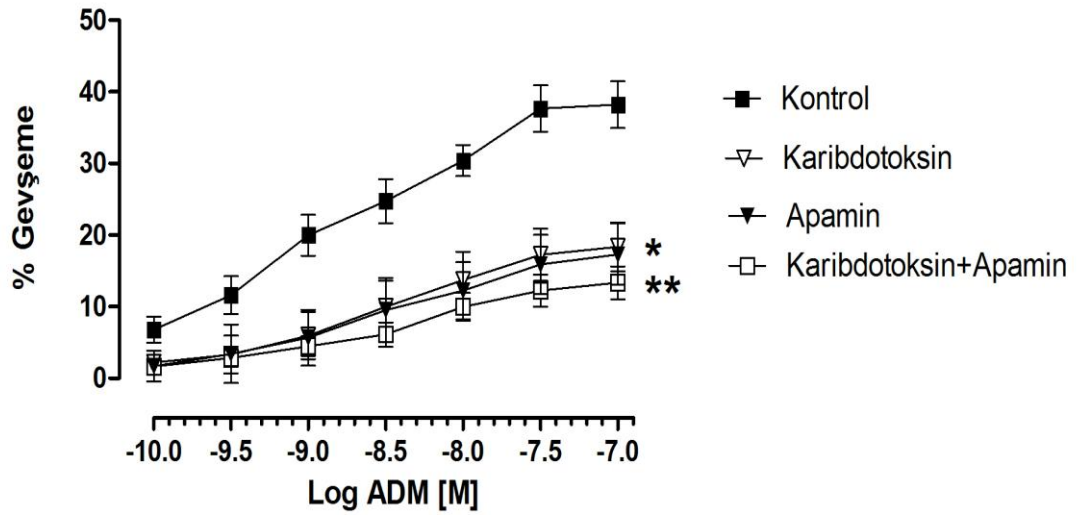
Şekil 4.3. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam (■) insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=7) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ inkübasyonunun (5×10^{-5} M, 20 dk., n=8) etkisi. (*: $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında). Sonuçlar fenilefrin ile oluşan kasılmanın % gevşemesi olarak verilmiştir.



Şekil 4.4. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam (■) insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=10) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde putatif adrenomedullin (ADM) reseptör antagonisti ADM₍₂₂₋₅₂₎ inkübasyonunun (10^{-7} M, 20 dk., n=7) etkisi. (*: $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında). Sonuçlar fenilefrin ile oluşan kasılmanın % gevşemesi olarak verilmiştir.



Şekil 4.5. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam (■) insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=8) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde K_V kanal blokörü 4-aminopridin (4-AP, 5 mM, 10 dk., n=10), ve K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid (10^{-5} M, 30 dk., n=8) inkübasyonunun etkileri. Sonuçlar fenilefrin ile oluşan kasılmanın % gevşemesi olarak verilmiştir.



Şekil 4.6. Submaksimal (10^{-6} M) fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam (■) insan internal torasik arter halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda (10^{-10} - 10^{-7} M, n=8) uygulanan adrenomedullin'in (ADM) oluşturduğu gevşeme yanıtları üzerinde, BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M, 30 dk., n=6), SK_{Ca} kanal blokörü apamin (10^{-7} M, 30 dk., n=8) ve karibdotoksin (10^{-7} M) + apamin (10^{-7} M, n=6) inkübasyonunun etkileri. (*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında). Sonuçlar fenilefrin ile oluşan kasılmanın % gevşemesi olarak verilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada submaksimal konsantrasyonda uygulanan fenilefrin, insan ITA halkalarında stabil ve sürekli bir kasılmaya neden olmuş, zaman içerisinde fenilefrin ile oluşan kasılmada kendiliğinden gelişen bir azalma gözlenmemiştir. Önceden fenilefrin ile kasılan insan ITA halkalarına kümülatif olarak eklenen ADM, konsantrasyon bağımlı bir şekilde gevşeme yanıtlarına neden olmuş ve fenilefrin ile oluşan kasılmanın yaklaşık %40'ına varan bir maksimum gevşetici etki elde edilmiştir. ADM'nin temel biyolojik etkilerinden biri vazodilatasyondur ve hem in vivo hem de in vitro vazodilatör etkisi olduğu gösterilmiştir; ADM insan timus arterleri (107), koroner arteriyoller (9), köpeklerden izole edilen mezenterik, koroner, renal, femoral (32) arterler, sıçan aort halkaları (108) ve sığır retinal arterlerinde (109) konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmaktadır. Bu çalışmada literatürde ilk defa olmak üzere ADM'nin diğer vasküler dokulardakine benzer şekilde insan ITA preparatlarında da konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda ADM'nin insan ITA halkalarında %40'luk bir maksimum etkinlik (submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile oluşan kasılmanın yüzdesi olarak hesaplanmıştır) ve $8,72 \pm 0,18$ 'lik bir duyarlılıkla (pD_2) gevşeme yanıtları oluşturduğu saptanmıştır. Diğer taraftan ADM'nin diğer vasküler dokularda oluşturduğu gevşetici etkilerde E_{max} ve pD_2 değerleri karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar olduğu anlaşılmaktadır: ADM'nin endotelin-1 ile kasılan insan koroner arteriyollerindeki E_{max} değeri $\%70 \pm 10$ ve pD_2 değeri $9,2 \pm 0,3$ (9); $PGF_{2\alpha}$ ile ön kasılma yapılan sığır retinal arterlerindeki E_{max} değeri $\%59,2 \pm 1$, pD_2 değeri $7,9 \pm 0,03$ (109); tromboksan A_2 analogu U46619 ile ön kasılma yapılan domuz siliar arterlerindeki E_{max} ve pD_2 değerleri sırasıyla $\%85,5 \pm 3$ ve $7,4 \pm 0,1$ (110); noradrenalin ile ön kasılma yapılan gebe sıçanlardan izole edilen mezenter arterlerdeki E_{max} değeri $\%72,77 \pm 3,56$ pD_2 değeri $7,03 \pm 0,02$ (111) ve sıçan aortundaki E_{max} değeri $\%45,5 \pm 6,5$ ve pD_2 değeri $2,4 \pm 0,8$ (108) olarak bulunmuştur. ADM'nin insan ITA dokusundaki efikasitesi diğer türlerden alınan vasküler dokular ya da insan koroner arteriyolleri ile karşılaştırıldığında daha düşük görünmekle birlikte, ITA preparatının ADM'ye duyarlılığının yukarıdaki dokulardan daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. ADM etkinliği veya ADM'ye duyarlılıktaki bu farklılıkların dokunun alındığı tür, deneyin yapıldığı vasküler doku (dokunun yeri ve çapı) ve/veya ön kasılma için kullanılan ajan gibi yöntemsel farklılıklara bağlı olabileceği düşünülebilir.

ADM'nin insan ITA halkalarında oluşturduğu gevşetici etki, dokuların 20 dakika süreyle putatif ADM reseptör antagonisti $ADM_{(22-52)}$ ile (10^{-7} M) inkübe edilmesi sonucunda anlamlı olarak önlenmiş, ADM'nin maksimum gevşetici etkisinde %70'lere varan bir azalma meydana gelmiştir (E_{max} değerleri sırası ile $\%38,0 \pm 2,1$ ve $\%12,5 \pm 1,2$). ADM, biyolojik etkilerini CL ve çeşitli RAMP (RAMP1, RAMP2 ve RAMP3) kombinasyonu sonucu oluşan ADM reseptörleri aracılığıyla oluşturmaktadır. İnsan ADM ve CGRP reseptör antagonistleri (ADM_{22-52}

ve CGRP₈₋₃₇) kullanılarak spesifik ADM reseptörleri arasındaki farklar belirlenmiştir. ADM₍₂₂₋₅₂₎, CL/RAMP3 (ADM₂) reseptörlerine göre CL/RAMP2 (ADM₁) reseptörlerine daha fazla selektivite göstermektedir. Yani ADM'nin ADM₁ reseptörleri aracılığı ile oluşturduğu yanıtlar CGRP₈₋₃₇'e göre ADM₍₂₂₋₅₂₎ ile daha güçlü bir şekilde bloke olmaktadır (28). Bu çalışmada ADM'nin insan ITA halkalarında oluşturduğu gevşetici etkilerinin putatif ADM reseptör antagonisti ADM₍₂₂₋₅₂₎ ile çok büyük bir oranda antagonize edilmesi, bu dokuda ADM ile oluşan vazodilatasyonun büyük ölçüde ADM₁ reseptörleri aracılığı ile gerçekleştiğine işaret etmektedir. Benzer şekilde gebe sıçanların mezenterik arterlerinde de ADM ile oluşan gevşeme yanıtları ADM₍₂₂₋₅₂₎ ile inhibe edilmiş ve düşük konsantrasyonlarda ADM ile oluşan gevşeme yanıtına büyük ölçüde ADM₁ reseptörlerinin aracılık ettiği; yüksek konsantrasyonlardaki gevşeme yanıtında ise hem ADM₁ hem de ADM₂ reseptörlerinin rol oynadığı bildirilmiştir (111). Yine sığır retinal arterlerinde (109) ve insan koroner arteriyollerinde (9) ADM ile oluşan gevşeme yanıtında ADM₍₂₂₋₅₂₎ istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturmuştur (Sığır retinal arterlerinde E_{max} değerleri sırası ile %55,33 ± 9,65 ve %47,5 ± 8,26 ve insan koroner arteriyollerinde E_{max} değerleri sırası ile %64 ± 12 ve %30 ± 11).

Çalışmamızda ADM'ye gevşeme yanıtlarının endoteli sağlam ITA preparatlarında endoteli zedeli preparatlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu, ancak ADM'ye gevşeme yanıtının endotelin zedelenmesi ile tamamen bloke edilemediği saptanmıştır (E_{max} değerleri sırası ile %38,0 ± 2,1 ve %16,4 ± 2,1). ADM'nin insan timus arterleri (107), koroner arteriyoller (9), köpeklerden izole edilen mezenterik, koroner, renal, femoral arterler (32), sıçan aort halkaları (108), domuz siliar arterleri (110) ve sığır retinal arterleri (109) gibi değişik vasküler dokulardaki gevşetici etkilerinin endotel bağımlı olduğu bildirilmiştir. Zıt olarak, köpek retinal arterlerinde endotel bağımsız mekanizmalarla gevşeme yanıtı oluşturduğu saptanmıştır (112). Bu çalışmada ADM'nin endoteli sağlam ITA halkalarında maksimum gevşetici etkisinin endoteli zedeli halkalardakinden 2,5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla mevcut çalışmanın sonuçları ADM'nin insan ITA halkalarında oluşturduğu gevşeme yanıtlarının büyük ölçüde endotel bağımlı olduğuna, düşük bir ölçüde ise endotel bağımsız mekanizmalarla gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Bu görüşü destekler şekilde insan ITA halkalarının ADM'ye gevşeme yanıtlarında bir NOS blokörü olan L-NAME ve spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ inkübasyonu sonrası istatistiksel olarak anlamlı ölçülerde azalmalar saptanmıştır. Gerek L-NAME, gerekse ODQ inkübasyonu sonrası ADM'ye maksimum yanıtlarda yaklaşık %50'lik azalmalar (E_{max} değerleri sırasıyla %18,4 ± 1,0 ve %18,1 ± 0,7) olduğu gözlenmiştir. İnsan ITA halkalarının NOS blokajı veya guanilat siklaz inhibisyonu sonrası ADM'ye gevşeme yanıtları endoteli zedeli halkaların ADM'ye gevşeme yanıtları ile oldukça benzer (E_{max}: %16,4 ± 2,1) düzeydedir. İnsan ITA preparatlarında ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarının NO-sGMP yolağının farklı iki basamağını bloke eden ajanlar tarafından benzer ölçüde bloke edilmesi gözlenen gevşetici etkide endotel kaynaklı NO'in rolünü ortaya koymaktadır. Bu bulgu literatürdeki diğer çalışmalar tarafından da desteklenmektedir (9, 30, 34, 100, 101, 102, 107, 108, 109). ADM, sitokinle stimüle edilen vasküler düz kas hücrelerinde sAMP-bağımlı bir yolak aracılığı ile NO üretimini arttırmaktadır (6). Sağlıklı gönüllülerde ve kalp yetmezlikli hastalarda lokal ADM

infüzyonu ile oluşan vazodilatasyonun kısmen NO-bağımlı olduğu gösterilmiş, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında kalp yetmezliği olan hastalarda ADM ile oluşan vazodilatasyondaki azalmanın NO üretimindeki bozulmaya bağlı olduğu ileri sürülmüştür (30, 46). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmış ve ADM'nin gevşetici etkisinde endotel ve NO bağımlı mekanizmaların rolü olduğu bildirilmiştir. ADM'nin renal vazodilatör, diüretik ve natriüretik etkilerinin NOS blokörü L-NAME ile azaldığı, dolayısıyla endojen NO salınımı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (113). Ayrıca ADM'nin izole böbrekte endojen NO salınımını artırdığı gösterilmiştir (114). ADM'nin aort ve pulmoner arter halkalarında konsantrasyona bağımlı şekilde oluşturduğu gevşeme yanıtları L-NAME uygulanması veya endotel'in zedelenmesi ile bloke olmaktadır (106). ADM'nin insan timus arterleri (107), koroner arteriyoller (9) ve sığır retinal arterlerinde de (109) NO aracılığı ile gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir. Zıt olarak sıçan arka bacak vasküler yatağında (115) ve köpek femoral venlerinde (116) ADM'ye vazodilatör yanıtların NO aracılı olmadığı bildirilmiştir.

ADM aracılı NO salınımının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte ADM vasküler endotel hücrelerde bulunan reseptörleri aracılığı ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırabilir ve NO salınımına yol açabilir. Bu görüşle uyumlu olarak sığır karotid arter endotel hücre kültürlerinde ADM'ye yanıt olarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda geçici bir artma olduğu gösterilmiştir (114). Benzer şekilde Shimokake ve ark. sığır aortik endotel hücre kültürlerinde ADM'nin intraselüler kalsiyum ve sGMP konsantrasyonunu artırdığını bildirmişlerdir (8). eNOS aktivitesi intraselüler kalsiyum ve kalmodulin konsantrasyonuna bağımlıdır. ADM'nin yukarıda sözü edilen bulgularla uyumlu olarak, benzer şekilde insan ITA dokusunun endotel hücrelerinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak eNOS'u aktive etmesi ve bu şekilde vasküler endotelden NO salınımına neden olarak gevşetici etki oluşturması olası mekanizmalardan biri gibi görünmektedir.

ADM trombositlerde sAMP düzeylerini artıran bir peptid olarak keşfedilmiştir (1). Daha sonra ADM'nin sAMP düzeylerini artırıcı etkisi pek çok doku ve hücrede teyid edilmiştir (1, 5, 7). sAMP artışı protein kinaz A aktivasyonu ile sonuçlanır. eNOS aktivasyonu üzerinde sAMP bağımlı protein kinaz fosforilasyonunun da rol oynayabileceği bildirilmiştir (117).

Vasküler düz kas hücreleri üzerinde NO'nin direkt etkisinin yanısıra, ADM'ye gevşeme yanıtının sürdürülmesinde, endotel kökenli NO üretimini potansiyalize ya da stimüle eden diğer reseptör ya da kanalların rol oynaması da söz konusudur. Örneğin, NO'nin vasküler düz kas hücrelerinde kalsiyumla aktive edilen potasyum kanallarını direkt olarak aktive ettiği gösterilmiştir (118). Ayrıca, NO sGMP bağımlı bir mekanizma aracılığı ile vazokonstriktör maddelerin (örn; endotelin) üretimini de azaltmaktadır (119).

Vasküler düz kasların çeşitli ajanlara yanıtlarındaki farklılıkta arterin alındığı yer ve çapına bağlı olarak iyon transport mekanizmaları, farmakolojik reseptörlerin yoğunluğu ve tipleri veya endotelden salınan maddelerdeki farklılıkların önemli bir rol oynayabileceği bilinmektedir (120-122). Damar çapındaki azalma ile paralel bir şekilde hiperpolarizan faktörlerin önemi de artmaktadır (123-125). Bu görüşlerle uyumlu olarak çeşitli vasküler dokularda ADM'nin gevşetici etkilerinde değişik

potasyum kanallarının rol oynadığı gösterilmiştir. Köpek koroner vasküler yatağında (10) ve sıçan serebral arteriyollerinde (11) ADM ile oluşan gevşemeye K_{ATP} kanallarının aracılık ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid ve K_v kanal blokörü 4-AP incelenen konsantrasyonlarda insan ITA halkalarında ADM ile oluşan gevşeme yanıtları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Bu bulgu insan ITA halkalarında ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarına K_{ATP} ve K_v kanallarının aracılık etmediğine işaret etmektedir. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak sıçan mezenter arterlerinde ADM ile oluşan gevşemeye K_{ATP} kanallarının aracılık etmediği bildirilmiştir (126). Diğer taraftan domuz siliar arterlerinde BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin ve SK_{Ca} kanal blokörü apamin kombinasyonu ile ADM'ye gevşeme yanıtlarının azaldığı bildirilmiştir (110). Yine gebe sıçanlardan izole edilen mezenter arterlerde ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında K_{Ca} kanallarının rol oynadığı gösterilmiştir (111). Benzer şekilde bu çalışmada insan ITA halkalarının kalsiyuma duyarlı potasyum kanal blokörleri ile inkübasyonu ADM'ye gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalarla sonuçlanmıştır. Gerek BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin, gerekse SK_{Ca} kanal blokörü apamin ITA preparatlarının ADM'ye gevşeme yanıtlarında benzer düzeylerde (her ikisi için yaklaşık %50) azalmaya neden olmuş, iki kanal blokörünün kombinasyonu ile ADM'ye gevşeme yanıtlarında daha fazla bir azalma gözlenmişse de, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Bu bulgular ADM'nin insan ITA halkalarındaki gevşetici etkisinde K_{Ca} kanallarının rol oynadığına işaret etmektedir.

Köpeklerde ADM ile oluşan renal vazodilatasyon ve natriürezde (58) ve sıçan pulmoner arterlerinde ADM'nin oluşturduğu gevşetici etkide (106) prostaglandinlerin rol oynadığı bildirilmiştir. Zıt olarak bizim çalışmamızda dokuların 20 dakika süreyle siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) ile inkübasyonu insan ITA halkalarının ADM'ye gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Dolayısıyla ADM'nin insan ITA halkalarında oluşturduğu gevşetici etkide lokal olarak üretilen siklooksijenaz ürünlerinin rolü olmadığı anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada ADM, endoteli sağlam ITA halkalarında $0,1$ nM – $0,1$ μ M konsantrasyon aralığında ve $8,72 \pm 0,18$ 'lik bir pD_2 değeri ile (EC50: yaklaşık 2 nM) gevşeme yanıtları oluşturmuştur. Normal koşullar altında ADM'nin plazma konsantrasyonu 1-10 pmol/l'dir. Kalp yetmezliği ve myokard enfarktüsü olan hastaların plazma ADM düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği bildirilmekle birlikte (19, 83, 127, 128) literatürdeki en yüksek değer myokard enfarktüsli hastalarda saptanan 17 ± 1 pmol/l'dir (128). İnsan ITA preparatı koroner bypass grafiti olarak sık bir şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla pM düzeylerindeki plazma ADM konsantrasyonlarının koroner bypass hastalarında ITA grafitleri üzerinde direkt bir etki oluşturması beklenemez. Diğer taraftan vazospastik anjina sırasında ADM geninde hipoksi ile indüklenebilen elementlerin aktivasyonu sonucu (79) koroner dolaşımdaki ADM düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (80). Dolayısıyla, ADM düzeylerindeki lokal ve geçici artmaların bypass sırasında veya sonrasındaki vazospazmlara karşı koruma sağlayabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada literatürde ilk defa olmak üzere ADM'nin insan ITA preparatında fonksiyonel gevşetici etkisine yönelik farmakolojik kanıt sağlanmıştır. Elde edilen bulgular insan ITA preparatlarında ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında hem kalsiyumla aktive edilen potasyum kanallarının hem de NO salınması aracılığı ile endotelin temel bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

SONUÇLAR

İnsan ITA halkalarında ADM'nin etkileri ve bu etkilerde endotel, nitrik oksid, prostanoidler ve potasyum kanalları gibi çeşitli faktörlerin rollerini araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada;

1. Fenilefrin ile önceden kasılmış insan ITA halkalarında kümülatif konsantrasyonlarda uygulanan ADM gevşeme yanıtları oluşturdu. ADM'nin gevşetici etkisi endoteli sağlam ITA halkalarında, endoteli zedelenmiş ITA halkalarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu.

2. Oluşan gevşeme yanıtlarının NOS blokörü L-NAME, spesifik guanilat siklaz inhibitörü ODQ, putatif ADM reseptör antagonisti ADM₍₂₂₋₅₂₎, BK_{Ca} kanal blokörü karibdotoksin, SK_{Ca} kanal blokörü apamin ve karibdotoksin + apamin varlığında anlamlı bir şekilde inhibe edildiği görüldü. Ancak siklooksijenaz inhibitörü indometazin, K_V kanal blokörü 4-AP ve K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid varlığında ADM ile oluşan gevşeme yanıtlarında anlamlı bir değişikliğin oluşmadığı gözlemlendi.

Böylece fenilefrin ile önceden kasılmış insan ITA halkalarında ADM'nin gevşetici bir etki oluşturduğu ve bu etkide hem kalsiyumla aktive edilen potasyum kanallarının hem de NO salınması aracılığı ile endotelin temel bir rol oynadığı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192:553–560, 1993.
2. Kapas S, Martinez A, Cuttitta F, et al. Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa. *J Endocrinol*, 156:477-484, 1998.
3. Nishikimi T, Kitamura K, Saito Y, et al. Clinical Studies on the sides of the production and clearance of circulating adrenomedullin in human subjects. *Hypertension*, 24:600-604, 1994.
4. Pio R, Martinez A, Elsasser TH, et al. Presence of immunoreactive adrenomedullin in human and bovine milk. *Peptides*, 21:1859-1863, 2000.
5. Eguchi S, Hirata Y, Iwasaki H, et al. Structure-activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 135:2454-2458, 1994.
6. Eguchi S, Hirata Y, Kano H, et al. Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 340:226-230, 1994.
7. Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, et al. Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 200:642-646, 1994.
8. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, et al. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 270:4412-4417, 1995.
9. Terata K, Miura H, Liu Y, et al. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K⁺ channels. *J Physiol Heart Circ Physiol*, 279:H2620-2626, 2000.
10. Sabates BL, Pigott JD, Choe EU, et al. Adrenomedullin mediates coronary vasodilation through adenosine receptors and K⁺ ATP channels. *J Surg Res*, 67:163-168, 1997.
11. Lang MG., Paterno R., Faraci FM., et al. Mechanism of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arteriols. *Stroke*, 28:181-185, 1997.

12. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, et al. Adrenomedullin induces endothelium dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt dependent pathway in rat aorta. *Circ Res*, 89:63-70, 2001.
13. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, et al. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 194:720–725,1993
14. Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, et al. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 195:921–927, 1993.
15. Julián M, Cacho M, García MA, et al. Adrenomedullin: a new target for the design of small molecule modulators with promising pharmacological activities. *Eur J Med Chem*, 40(8):737-750, 2005.
16. Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin and PAMP: Discovery, Structures and Cardiovascular Functions. *Microvasc Res Technol*, 57:3-13, 2002.
17. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide. *Endocrine Reviews*, 21(2):138-167, 2000.
18. Bunton DC, Petrie MC, Hillier C, et al. The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacol Ther*, 103(3):179-201, 2004.
19. Nishikimi T, Yoshihara F, Mori Y, et al. Cardioprotective effect of adrenomedullin in heart failure. *Hypertens Res*, 26:S121-127, 2003.
20. Sugo S, Minamiro N, Kanagawa K. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 201:1160– 1166, 1994.
21. Nagata N, Kato J, Kitamura K, et al. Dissociation of adrenomedullin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in pregnant and non-pregnant women. *Eur J Endocrinol*, 139:611–614, 1998.
22. Zudaire E, Cuttitta F, Martínez A. Regulation of pancreatic physiology by adrenomedullin and its binding protein. *Regul Pept*, 112(1-3):121-130, 2003.
23. Hofbauer, K. H., Schoof, E., Kurtz, A., et al. Inflammatory cytokines stimulate adrenomedullin expression through nitric oxide-dependent and -independent pathways. *Hypertension*, 39:161–167, 2002.
24. Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin-what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol*, 56:5–27, 2004.

25. Sato K, Hirata Y, Imai T, et al. Characterization of immunoreactive adrenomedullin in human plasma and urine. *Life Sci*, 57:189–194, 1995.
26. Asakawa H, Nishikimi T, Suzuki T, et al. Elevation of two molecular forms of adrenomedullin in plasma and urine in patients with acute myocardial infarction treated with early coronary angioplasty. *Clin Sci*, 100:117–126, 2001.
27. Debbie LH, David MS. ADM receptors: molecular identity and function. *Peptides*, 22:1753-1763, 2001.
28. Hay DL, Howitt SG, Connor AC, et al. CL/RAMP2 and CL/RAMP3 produce pharmacologically distinct adrenomedullin receptors: a comparison of effects of adrenomedullin 22–52, CGRP8–37 and BIBN4096BS. *Br J Pharmacol*, 140: 477–486, 2003.
29. Ueda K, Teragawa H, Kimura M, et al. Adrenomedullin causes coronary vasodilation in humans: effects of inhibition of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 46(4):534-539, 2005.
30. Yanagawa B, Nagaya N. Adrenomedullin: molecular mechanisms and its role in cardiac disease. *Amino Acids*, 32(1):157-164, 2007.
31. Nagaya N, Miyatake K, Kyotani S, et al. Pulmonary vasodilator response to adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Hypertens Res*, 26:S141–S146, 2003.
32. Nakamura K, Toda H, Terasako K, et al. Vasodilative effect of adrenomedullin in isolated arteries of the dog. *JNP J Pharmacol*, 67:259-262, 1995.
33. Baskaya MK, Suzuki Y, Anzai M, et al. Effects of adrenomedullin, calcitonin gene related peptide and amylin on cerebral circulation in dogs. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 15:827-834, 1995.
34. Tian Q, Zhado D, Tan YD, et al. Vasodilator effect of human adrenomedullin (13-52) on hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 73:1065-1069, 1995.
35. Entzeroth M, Doods HN, Wieland HA, et al. Adrenomedullin mediates vasodilation via CGRP1 receptors. *Life Sci*, 56:PL19-PL25, 1995.
36. He H, Bessho H, Fujisawa Y, et al. Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional haemodynamics in rats. *Eur J Pharmacol*, 273:209–214, 1995.
37. Ishiyama Y, Kitamura K, Ichiki Y, et al. Hemodynamic effects of a novel hypotensive peptide, human adrenomedullin, in rats. *Eur J Pharmacol*, 241:271–273, 1993.

38. Nuki C, Kawasaki H, Kitamura K, et al. Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds. *Biochem Biophys Res Commun*, 196:245–251, 1993.
39. Berthiaume N, Claing A, Lipton H, et al. Rat adrenomedullin induces a selective arterial vasodilation via CGRP1 receptors in the double-perfused mesenteric bed of the rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 73:1080–1083, 1995.
40. Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, et al. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:1016–1020, 2000.
41. Murakami S, Kimura H, Kangawa K, et al. Physiological significance and therapeutic potential of adrenomedullin in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 6(2):125-132, 2006.
42. Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 101:498–503, 2000.
43. Oya H, Nagaya N, Furuichi S, et al. Comparison of intravenous adrenomedullin with atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol*, 86:94–98, 2000.
44. De Matteo R, May CN. Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 140:1414– 1420, 2003.
45. Heaton J, Lin B, Chang JK, et al. Pulmonary vasodilation to AM: a novel peptide in humans. *Am J Physiol*, 268:H2211 – H2215, 1995.
46. Cockcroft JR, Noon JP, Gardner-Medwin J, et al. Haemodynamic effects of adrenomedullin in human resistance and capacitance vessels. *Br J Clin Pharmacol*, 44:57–60, 1997.
47. Shirai M, Shimouchi A, Ikeda S, et al. Vasodilator effects of adrenomedullin on small pulmonary arteries and veins in anaesthetized cats. *Br J Pharmacol*, 121:679–686, 1997.
48. Sugano T, Tsuji H, Masuda H, et al. Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:1078–1083, 2001.
49. Perret M, Broussard H, Legros T, et al. The effect of adrenomedullin on the isolated heart. *Life Sci*, 53:L377–L379, 1993.

50. Ikenouchi H, Kangawa K, Matsuo H, et al. Negative inotropic effect of adrenomedullin in isolated adult rabbit cardiac ventricular myocytes. *Circulation*, 95:2318–2324, 1997.
51. Ihara T, Ikeda U, Tate Y, et al. Positive inotropic effects of adrenomedullin on rat papillary muscle. *Eur J Pharmacol*, 390:167–172, 2000.
52. Saetrum Opgaard O, Hasbak P, de Vries R, et al. Positive inotropy mediated via CGRP receptors in isolated human myocardial trabeculae. *Eur J Pharmacol*, 397:373–382, 2000.
53. Nagaya N, Goto Y, Satoh T, et al. Intravenous adrenomedullin in myocardial function and energy metabolism in patients after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39:754–760, 2002.
54. Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, et al. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol*, 43:R979–R984, 1998.
55. Takahashi H, Watanabe TX, Nishimura M, et al. Centrally induced vasopressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am J Hypertens*, 7:478–482H, 1994.
56. Allen MA, Smith PM, Ferguson AV. Adrenomedullin microinjection into the area postrema increases blood pressure. *Am J Physiol*, 272:R1698–R1703, 1997.
57. Israel A, Diaz E. Diuretic and natriuretic action of adrenomedullin administered intracerebroventricularly in conscious rats. *Regul Peptides*, 89:13–18, 2000.
58. Leclerc M, Brunette MG. The paradoxical effect of adrenomedullin on Na⁺ transport by the renal distal tubule luminal membrane. *Mol Cell Endocrinol*, 164(1-2):159-167, 2000.
59. Ebara T, Miura K, Okumura M, et al. Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and functions in dogs. *Eur J Pharmacol*, 263:69–73, 1994.
60. Troughton RW, Frampton CM, Lewis LK, et al. Differing thresholds for modulatory effects of adrenomedullin infusion on haemodynamic and hormone responses to angiotensin II and adrenocorticotrophic hormone in healthy volunteers. *Clin Sci*, 101(1):103-109, 2001.
61. Petrie MC, Hillier C, Morton JJ, et al. Adrenomedullin selectively inhibits angiotensin II-induced aldosterone secretion in humans. *J Hypertens*, 18:61–64, 2000.

62. Thomson LM, Kapas S, Hinson JP. Paracrine effects of PAMP and adrenomedullin on the human adrenal H295R cell line: PAMP but not adrenomedullin stimulates DHEA secretion. *Regul Pept*, 112:3–7, 2003.
63. Zió³kowska A, Budzyńska K, Trejter M, et al. Effects of adrenomedullin and its fragment 22–52 on basal and ACTH stimulated secretion of cultured rat adrenocortical cells. *Int J Mol Med*, 11:613–615, 2003.
64. López J, Cuesta N. Adrenomedullin as a pancreatic hormone. *Microsc Res Tech.*, 57(2):61-75, 2002.
65. Tsuchida T, Ohnishi H, Tanaka Y, et al. Inhibition of Stimulated Amylase Secretion by Adrenomedullin in Rat Pancreatic Acini. *Endocrinology*, 140:865-870, 1999.
66. Nikitenko LL, MacKenzie IZ, Rees MC, et al. Adrenomedullin is an autocrine regulator of endothelial growth in human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 6(9):811-819, 2000
67. Ozbek E, Yurekli M, Soylu A , et al. The role of adrenomedullin in varicocele and impotence. *BJU Int*, 86(6):694-8, 2000.
68. Allaker RP, Kapas S. Adrenomedullin and mucosal defence: interaction between host and microorganism. *Regul Pept*, 112:147–52, 2003.
69. Kong XQ, Wang LX, Yang CS, Effects of adrenomedullin on the cell numbers and apoptosis of endothelial progenitor cells. *Clin Invest Med*, 31(3):E117-122, 2008
70. Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone*, 43(5):813-818, 2008.
71. Wolf K, Kurtz A, Pfeifer M, et al. Different regulation of left ventricular ANP, BNP and adrenomedullin mRNA in the twokidney, one-clip model of renovascular hypertension. *Pflugers Arch*, 442:212–7, 2001.
72. Kohno M, Hanehira T, Kano H, et al. Plasma adrenomedullin concentrations in essential-hypertension. *Hypertension*, 27:102–107, 1996.
73. Nishikimi T, Yoshihara F, Kanazawa A, et al. Role of increased circulating and renal adrenomedullin in rats with malignant hypertension. *Am J Physiol - Regul Integr C*, 281:R2079–R2087, 2001.
74. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, et al. Enhanced adrenomedullin production by mechanical stretching in cultured rat cardiomyocytes. *Hypertension*, 35:1210–1214, 2000.

75. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, et al. Beneficial effects of adrenomedullin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res*, 56:373–80, 2002.
76. Mok MY, Cheung BM, Lo Y, et al. Elevated plasma adrenomedullin and vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 34(11):2224-2229, 2007.
77. Zhang B, Tang C, Jiang Z, et al. Effects of adrenomedullin on vascular calcification in rats. *Z Kardiol*, 91:568–574, 2002.
78. Burley DS, Hamid SA, Baxter GF. Cardioprotective actions of peptide hormones in myocardial ischemia. *Heart Fail Rev*, 12:279-291, 2007.
79. Yoshihara F, Horio T, Nishikimi T, et al. Possible involvement of oxidative stress in hypoxia-induced adrenomedullin secretion in cultured rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*, 436:1–6, 2002.
80. Kamiya H, Okumura K, Sone T, et al. Plasma adrenomedullin levels in the coronary circulation in vasospastic angina pectoris. *Am J Cardiol*, 85:656–658, 2000.
81. Yin H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling. *Hypertension*, 43:109–116, 2004.
82. Morales MA, Del Ry S, Startari U, et al. Plasma adrenomedullin relation with Doppler-derived dP/dt in patients with congestive heart failure. *Clin Cardiol*, 29(3):126-130, 2006.
83. Randa Abdel Kader M, Grace BD, Badawi NE. Plasma levels of adrenomedullin and atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure of various etiologies. *Ital J Biochem*, 56(1):18-27, 2007.
84. Obineche EN, Pathan JY, Fisher S, et al. Natriuretic peptide and adrenomedullin levels in chronic renal failure and effects of peritoneal dialysis. *Kidney Int*, 69(1):152-156, 2006.
85. Kinoshita H, Fujimoto S, Kitamura K, et al. Increased plasma levels of mature adrenomedullin in chronic glomerulonephritis. *Nephron*, 86:333–338, 2000.
86. Mori Y, Nishikimi T, Kobayashi N, et al. Long-term adrenomedullin infusion improves survival in malignant hypertensive rats. *Hypertension*, 40:107–113, 2002.

87. Dobrzyński E, Wang C, Chao J, et al. Adrenomedullin gene delivery attenuates hypertension, cardiac remodeling, and renal injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 36:995–1001, 2000.
88. Nishikimi T. Adrenomedullin in the Kidney-Renal Physiological and Pathophysiological Roles. *Curr Med Chem*, 14:1689-1699, 2007.
89. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium*, 14(6):345-351, 2007.
90. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, et al. Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation*, 101:2309–2316, 2000.
91. Sekine N, Takano K, Kimata-Hayashi N, et al. Adrenomedullin inhibits insulin exocytosis via pertussis toxin-sensitive G protein-coupled mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291: E9–E14, 2006
92. Hayashi M, Shimosawa T, Fujita T. Hyperglycemia increases vascular adrenomedullin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 258:453–456, 1999.
93. Kinoshita H, Kato K, Kuroki M, et al. Plasma adrenomedullin levels in patients with diabetes. *Diabetes Care*, 23:253–254, 2000.
94. Hiragushi K, Wada J, Eguchi J, et al. The role of adrenomedullin and receptors in glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int*, 65:540–550, 2004.
95. Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmaco-mechanical coupling a vascular smooth muscle. *JPET*, 159: 129, 1968.
96. Guyton AC, Hall JE. Düz kasın uyarılması ve kasılması. *Tıbbi Fizyoloji*, Bölüm 8, 9. Baskı.
97. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Reviews*, 76:967-1003, 1996.
98. Kobayashi H, Yamamoto R, Kitamura K, et al. Cyclic AMP-dependent synthesis and release of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Eur J Biochem*, 263:702–708, 1999.
99. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide: *British J Surg*, 82: 1598-1610, 1995.

100. Kato J, Kitamura K, Kangawa K, et al. Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 289:383–385, 1995.
101. Matsunaga K, Iwasaki T, Yonetani Y, et al. Nitric oxide-associated relaxing effects of adrenomedullin in rat aorta. *Drug Dev Res*, 38:62–66, 1996.
102. Fan G, Niu CY, Han M, et al. Effect of adrenomedullin on mesenteric microvessels and microlymphatics in rat. *Acta Physiol Sin*, 49:115–118, 1997.
103. Jenkinson DH. Potassium channels-multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol*, 147: 63-71, 2006.
104. Eun A Ko, Jin Han, In Duk Jung. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 44 (2):65-81, 2008.
105. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş Yayınları, 1447, Ankara, 2002.
106. Yang BC, Lipton H, Gumusel B, et al. Adrenomedullin dilates rat pulmonary artery rings during hypoxia: role of nitric oxide and vasodilator prostaglandins. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28:458–462, 1996.
107. Champion HC, Bivalacqua TJ, Pierce RL, et al. Responses to human CGRP, ADM and PAMP in human thymic arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284:R531-R537, 2003.
108. Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, et al. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*, 123:1645-1654, 1998.
109. Boussery K, Delaey C, Van de Voorde J. Influence of adrenomedullin on Tone of Isolated Bovine Retinal Arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:552-559, 2004.
110. Dettmann ES, Vysniaunskiene I, Wu R, et al. Adrenomedullin-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Porcine Ciliary Arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44:3961-3966, 2003.
111. Ross GR, Yallampalli C. Endothelium-Independent Relaxation by Adrenomedullin in Pregnant Rat mesenteric Artery: Role of cAMP-Dependent Protein Kinase A and Calcium-Activated Potassium Channels. *JPET*, 317:1269-1275, 2006.
112. Okamura T, Ayajiki K, Kangawa K, et al. Mechanism of adrenomedullin-induced relaxation in isolated canine retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 38:56–61, 1997.

113. Miura K, Ebara T, Okumura M, et al. Attenuation of adrenomedullin-induced renal vasodilatation by NG-nitro L-arginine but not glibenclamide. *Br J Pharmacol*, 115:917–924, 1995.
114. Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, et al. Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Hypertension*, 25:790–795, 1995.
115. Feng CJ, Kang B, Kaye A.D, et al. L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci* 55, L433–L438, 1994.
116. Barber DA, Park YS, Burnett Jr JC, Miller VM Adrenomedullin-mediated relaxations in veins are endothelium-dependent and distinct from arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 30:695–701, 1997.
117. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, et al.. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 275: 5179–5187, 2000.
118. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368:850–853, 1994.
119. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, 85:587–590, 1990.
120. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev*, 70:921–961, 1990.
121. Clark SG, Fuchs LC. Role of nitric oxide and Ca²⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. *J Pharmacol Exp Ther*, 282:1473–1479, 1997.
122. Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chatterjee M. Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of the rat mesenteric vascular bed. *Am J Physiol*, 266:H952–H958, 1994.
123. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, et al. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28:703–711, 1996.
124. Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Ann Rev Physiol*, 57:771-790, 1995.

125. Wu CC, Chen SJ, Yen MH. Different responses to acetylcholine in the presence of nitric oxide inhibitor in rat aortae and mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 20:405–412, 1993.
126. Champion HC, Pierce RL, Bivalacqua TJ, et al. Analysis of responses to hAmylin, hCGRP, and hADM in isolated resistance arteries from the mesenteric vascular bed of the rat. *Peptides*, 22:1427–1434, 2001.
127. Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, et al. Adrenomedullin and heart failure. *Regul Peptides*, 112:51-60, 2003.
128. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation*, 97:1921–1929, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Zeliha BAYRAM, 29.03.1984'de Akşehir'de doğdu. İlk öğrenimini Bayat Merkez İlkokulu'nda (1989-1994), orta öğrenimini Akşehir Merkez Ortaokulu'nda (1994-1997), lise öğrenimini Akşehir Selçuklu Süper Lisesi'nde (1997-2001) tamamladı. 2005 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldu. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde hastane eczacısı olarak çalışmaya başladı. 2005-2006 Eğitim Öğretim Yılı Bahar Dönemi'nde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Eczane biriminde eczacı olarak çalışmaktadır.